

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas - ICEx
Programa de Pós-Graduação em Física

Gladystone Rocha da Fonseca

**MICROSCÓPIO HIPERESPECTRAL COM APLICAÇÕES EM
BIOMATERIAIS**

Belo Horizonte
2021

Gladystone Rocha da Fonseca

Microscópio Hiperespectral com aplicações em biomateriais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Ana Maria de Paula

Belo Horizonte

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F676m Fonseca, Gladystone Rocha da.
Microscópio hiperespectral com aplicações em biomateriais / Gladystone
Rocha da Fonseca. – 2021.
81f., enc.

Orientadora: Ana Maria de Paula.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Física.
Bibliografia: f.53-55.

1. Espectroscopia. 2. Biofotônica. 3. Microscopia ótica - teses.
I. Título. II. Paula, Ana Maria de. III. Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Física.

CDU – 535 (043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

A presente dissertação, intitulada “**Microscópio Hiperespectral com aplicações em biomateriais**” de autoria de **GLADYSTONE ROCHA DA FONSECA**, submetida à Comissão Examinadora, abaixo-assinada, foi aprovada para obtenção do grau de **MESTRE EM FÍSICA** em 05 de fevereiro de 2021.

Belo Horizonte, 05 de fevereiro de 2021.

Profa. Ana Maria de Paula

Orientadora do estudante

Departamento de Física/UFMG

Profa. Karla Balzuweit

Departamento de Física/UFMG

Prof. Ubirajara Agero Batista

Departamento de Física/UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria de Paula, Professora do Magistério Superior**, em 05/02/2021, às 20:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ubirajara Agero Batista, Servidor(a)**, em 05/02/2021, às 20:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karla Balzuweit, Professora do Magistério Superior**, em 05/02/2021, às 21:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gladystone Rocha da Fonseca, Usuário Externo**, em 11/02/2021, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0557006** e o código CRC **2034B108**.

Agradecimentos

À Ana Maria de Paula, pela orientação e pela amizade. Agradeço por todo o ensinamento e por ter indicado os melhores caminhos para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço também por todas as risadas e bons momentos que tornaram este período inesquecível.

À Bárbara Elza Nogueira de Faria pela colaboração no desenvolvimento do trabalho com o Microscópio Hiperespectral. Agradeço por compartilhar o seu conhecimento sobre a montagem experimental e tratamento dos dados.

Aos meus pais, Glória e Benício, por todo apoio e ensinamento.

À Pâmella Miranda, pelo companheirismo e pelos momentos felizes que passamos juntos.

Ao Cristian Manzoni pela colaboração entre a Universidade Politecnico di Milano e o Laboratório de Biofotônica que contribui para implementação da montagem do Microscópio Hiperespectral e outros trabalhos do grupo.

Ao Mychel Gonçalves Silva pelo desenvolvimento dos software de controle e aquisição de dados do Microscópio Hiperespectral.

Ao grupo do Professor Marcelo Mamede da Faculdade de Medicina da UFMG pela colaboração com o Laboratório de Biofotônica e fornecimento de amostras.

Ao Aloísio Miguel Garcia por compartilhar as amostras utilizadas em seu trabalho.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biofotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais: Mychel, Aloísio, Bárbara, Danielle, Luana, Egleidson, Maria Gabriela Moreira, Gabriela Militani e Giovanna. Agradeço pelas reuniões de grupo que ajudaram a desenvolver este trabalho.

Aos Professores das disciplinas cursadas durante o Mestrado: Mario Sérgio, Ronald Dickman, Leandro Malard, Gerald Weber e Ricardo Nunes.

Aos Professores do Departamento de Física da UFMG.

Aos Professores do Instituto de Ciências Exatas, da Faculdade de Educação e do Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos colegas e amigos do Departamento de Física: Bárbara, Samuel, Guilherme, Clóvis, Marcello, Mário, Ludmila, Tamiris, Clara, Maria Clara, Jéssica, Geovani, Saulo, Thiago, Ana Paula, Everton, Gustavo, Lucas, Daniel, Raphael, André, Cleiton e Gabriel entre muitos outros. Obrigado pelas conversas e pela amizade.

À Shirley, Gislene e todos os funcionários e bolsistas da Biblioteca da Física por toda ajuda.

À Marília Pacheco Diniz e Ana Luiza de Souza, da Secretaria do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Física, pelo excelente atendimento e ajuda na solução de todos os problemas.

Aos trabalhadores da Universidade Federal de Minas Gerais pelo funcionamento e manutenção da Universidade.

Às agências de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Resumo

O Imageamento Hiperespectral (IH) é uma técnica utilizada para obter a assinatura espectral de uma amostra com resolução espacial, permitindo a identificação de um ou mais espectros em uma mesma amostra. O IH é amplamente utilizado em escala macroscópica para a caracterização e estudo de amostras em diversas áreas de aplicação desde o sensoriamento remoto da superfície do planeta à conservação e restauração de obras de arte. Nos últimos anos apreciamos o desenvolvimento do IH em escala microscópica, isto é imagens com resolução espacial da ordem de micrometros com resolução espectral. A aplicação de técnicas ópticas em conjunto com o imageamento microscópico é de grande interesse para o estudo de materiais biológicos, especialmente as aplicações como ferramentas auxiliares para diagnósticos patológicos. Atualmente os métodos de diagnóstico se baseiam majoritariamente na análise visual dos tecidos, o que envolve procedimentos de preparação das amostras que implicam custos financeiros e demandam tempo para cortes e colorações para obtenção das lâminas de microscopia. A literatura aponta vantagens na utilização de técnicas ópticas, especialmente a espectroscopia óptica, como uma possível ferramenta de diagnóstico de patologias. Resultados recentes apontam a possibilidade da utilização da espectroscopia óptica em conjunto com o imageamento microscópico para o diagnóstico de pré-câncer, isto é, o estágio próximo do início do desenvolvimento do câncer em que a morfologia do tecido ainda não foi alterada o suficiente para o diagnóstico com os métodos amplamente utilizados. Neste trabalho apresentamos o desenvolvimento de um Microscópio Hiperespectral e a aplicação em materiais biológicos. O microscópio hiperespectral (MH) consiste em um microscópio óptico customizado com a adaptação de um interferômetro baseado em materiais birrefringentes que servem como a base para um espectrômetro por Transformada de Fourier (ETF). Apresentamos uma revisão dos processos físicos que possibilitam a utilização de elementos birrefringentes em um ETF. Discutimos detalhes da montagem, como resolução espacial e espectral e apresentamos as rotinas de calibração usadas. Apresentamos amostras de calibração, amostras de teste e a aplicação em cortes histológicos de biópsia em tecido de próstata.

Palavras-chave: Imageamento Hiperespectral, Microscópio Hiperespectral, birrefringência, interferometria, espectroscopia, Biofotônica, materiais biológicos.

Abstract

Hyperspectral Imaging (HI) is a technique used to obtain the spectral signature of a sample with spatial resolution, allowing the identification of one or more spectra from the sample. HI is widely used on macroscopic scale for characterization and study in a wide range of applications, from remote sensing of the planet's surface to art conservation and restoration. Recently, the development of HI on a microscopic scale has been achieved, that is, images with spatial resolution about micrometers and with spectral resolution. The application of optical techniques associated to microscopic imaging is a subject of interest for the study of biological materials, especially applications as accessory tools for pathological diagnosis. Currently, diagnostic methods are mainly based on tissue visual evaluation, which leads to the need for sample preparation procedures that imply financial costs and time for staining and preparing microscopic slides. The literature points out advantages in the use of optical techniques, especially optical spectroscopy, as a possible tool for diagnosing pathologies. In particular, the possibility of using optical spectroscopy associated to microscopic imaging for pre-cancer diagnosis, the stage close to the beginning of cancer development where the tissue morphology does not present observable alterations by the methods widely used for diagnosis. The aim of this work is to present the development of a Hyperspectral Microscope (HM) and its applications for analysis of biological materials. HM is a custom-made microscope coupled to a birefringent-based interferometer used to perform Fourier Transform Spectroscopy (FTS). We present a review of the physical processes that allow the use of birefringent elements in an FTS. We show the experimental details, such as spatial and spectral resolution and calibration routines. We also present results for calibration samples, test samples and the application in histological sections of prostate tissue biopsy.

Keywords: Hyperspectral Imaging, Hyperspectral Microscope, birefringence, interferometry, spectroscopy, biophotonics, biological materials.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	5
3	ESPECTRÔMETRO BASEADO EM BIRREFRINGÊNCIA	7
3.1	Birrefringência	7
3.2	Interferômetro TWINS	11
4	FOTOLUMINESCÊNCIA E OUTRAS FONTES DE LUZ	15
4.1	Fluorescência das amostras e fontes de excitação	16
4.2	Luminosidade de um fonte de luz $I_0(\lambda)$	19
4.3	Interação da iluminação com as amostras	20
4.3.1	Refletância de uma amostra $R(\lambda)$	20
4.3.2	Luminosidade Refletida $I_R(\lambda)$	21
4.3.3	Transmitância $T(\lambda)$	21
4.3.4	Absorbância $A(\lambda)$	22
4.4	Obtendo cores através de espectros	22
5	MICROSCÓPIO HIPERESPECTRAL	25
5.1	Microscópio	25
5.2	Interferômetro	28
5.3	Iluminação do microscópio	31
5.3.1	A Iluminação Köhler	31
5.3.2	Iluminação com laser	33
5.4	Calibração espacial	34
5.5	Calibração espectral	37
6	AMOSTRAS	39
7	RESULTADOS	41
7.1	Emissores RGB da tela de um telefone celular.	41
7.2	Fibras de papel coradas com rodamina	43
7.3	Tecido de próstata	45
7.3.1	Autofluorescência do colágeno	45
7.3.2	Fluorescência do corante eosina ligado às fibras de colágeno	46
7.3.3	Transmissão em tecido corado	48

8	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	51
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICES	57
	APÊNDICE A – DIFERENÇA DE FASE A PARTIR DA DIFERENÇA DE CAMINHO EM UM CRISTAL BIRREFRINGENTE	59
A.1	Diferença de caminho para as componente do campo Elétrico em um material birrefringente	59
	ANEXO A – ESPECTRO DE EMISSÃO DA LÂMPADA DE HG UTILIZADA PARA A CALIBRAÇÃO DO MH	69

1 Introdução

O Imageamento Hiperespectral (IH) [1–3] é uma técnica utilizada para se obter a imagem de um objeto com resolução espacial e espectral. O termo hiperespectral faz referência à largura da faixa espectral coberta (centenas de bandas ou espectro contínuo) nas medidas que variam de acordo com a técnica utilizada. O IH associa a cada pixel de uma imagem de um objeto o espectro correspondente. As primeiras publicações científicas envolvendo imageamento com informação espectral datam da década de 1980, tratando do desenvolvimento de uma técnica utilizada para o sensoriamento remoto da superfície do planeta Terra. A. Goetz e colaboradores [1] introduziram a técnica de imageamento com informação espectral coletados simultaneamente para aplicações de sensoriamento remoto. Neste trabalho os autores identificaram a presença de minerais dominantes na superfície do solo através da assinatura espectral em conjunto com o imageamento da área conforme apresenta a Figura 1.

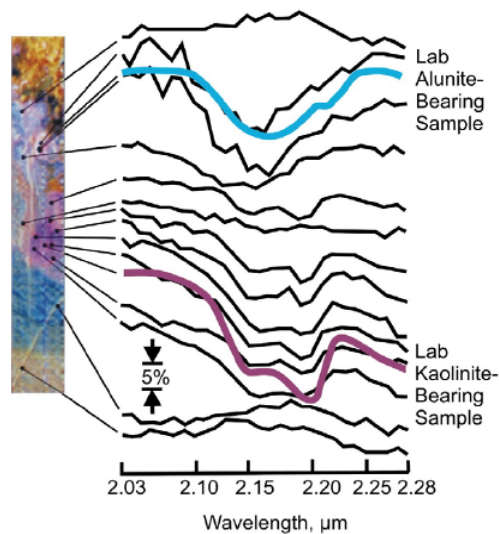


Figura 1 – Imageamento hiperespectral da superfície terrestre realizado na década de 1980. Comparação entre os espectros medidos em campo (linha em preto) e as referências medidas em laboratório (linhas coloridas) identificam a presença de dois minerais dominantes em regiões distintas. Figura retirada de [2].

A técnica utilizada foi o imageamento aéreo utilizando elementos dispersivos para decomposição espectral e 128 filtros com banda de transmissão estreita ($\Delta\lambda \approx 9$ nm em cada filtro) e contíguos na região do visível e infravermelho próximo (400 nm - 2500 nm). Dados espectroscópicos de minerais presentes no solo analisadas em laboratório foram utilizados para a calibração dos primeiros equipamentos portáteis.

A Figura 2 apresenta as descrições das técnicas de imageamento e espectroscopia.

As técnicas recentes de IH baseadas em materiais birrefringentes e espectrômetro por Transformada de Fourier produzem um espectro contínuo.

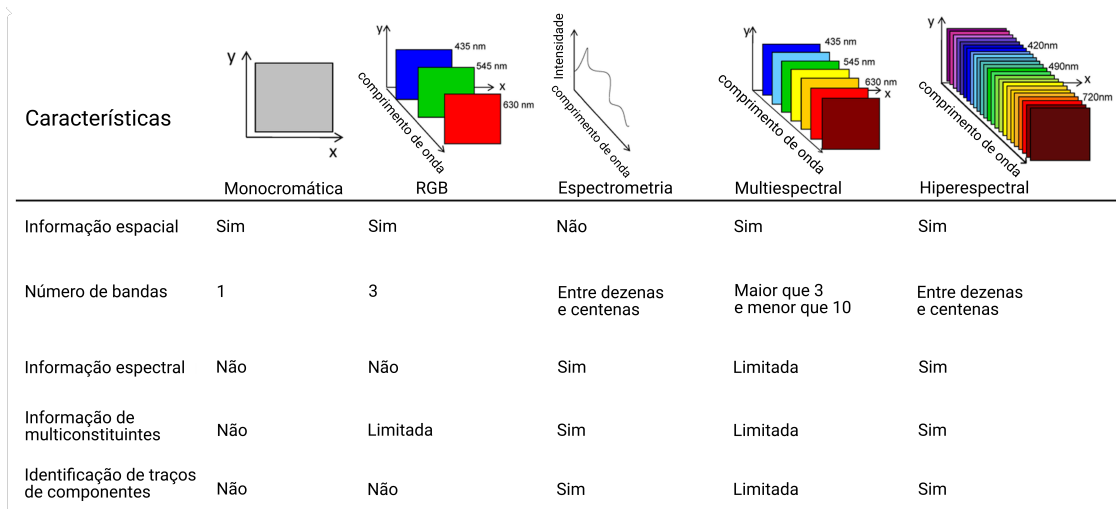


Figura 2 – Descrição e característica das técnicas de imageamento e espectrometria. Figura adaptada de [3].

À medida que a técnica se tornou promissora, o imageamento hiperespectral começou a ser utilizado como ferramenta presente em satélites e espaçonaves. Esses estudos ajudaram a consolidar as ferramentas e técnicas utilizadas para o melhor entendimento da superfície terrestre, tais como a composição do solo através da presença de minerais e a identificação e mapeamento de grandes áreas de vegetação, desertos e áreas urbanas. Posteriormente as técnicas combinadas de imageamento e espectroscopia foram utilizadas para estudar também os oceanos [4]. Com o desenvolvimento da técnica, novas possibilidades de configuração experimental foram propostas possibilitando também o estudo de objetos, tais como obras de arte e alimentos [5,6]. Essas melhorias estão relacionadas tanto à capacidade de resolução espacial (capacidade de distinguir objetos pequenos próximos uns aos outros) quanto resolução espectral (capacidade de separar assinaturas espectrais distintas em regiões próximas no espectro eletromagnético). As montagens experimentais mais recentes possibilitaram o IH para o estudo de amostras macroscópicas com escalas reduzidas para cerca de centímetros e poucos metros como é o caso da câmera hiperespectral [7].

A figura3 apresenta a imagem hiperespectral de um vitral em uma basílica da cidade de Milão [8]. Neste exemplo vemos o espectro de transmissão da luz solar através dos vidros que compõem o vitral. Vemos em detalhe um Mapa falso-RGB gerado a partir dos espectros de transmissão. Vemos ainda que os vidros de coloração azul dessa obra de arte possuem espectros de transmissão que diferem consideravelmente na região do infravermelho.

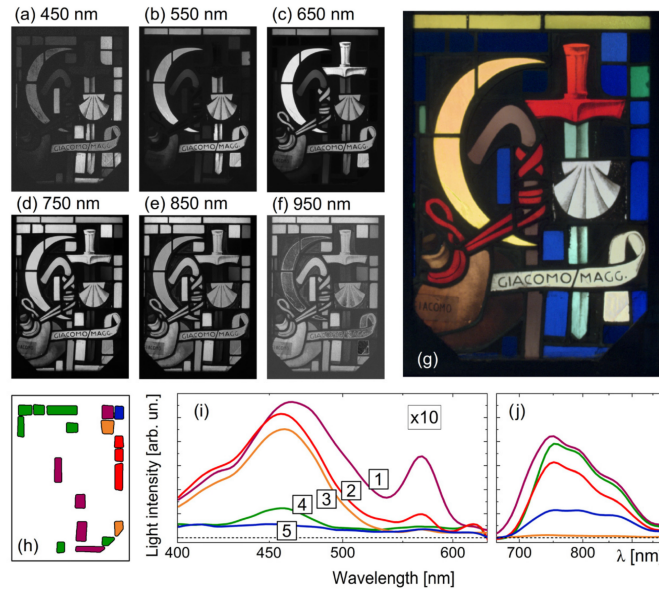


Figura 3 – Imagem hiperespectral de um vitral em uma basílica de Milão iluminado pela luz solar (transmissão). As figuras de (a) a (f) mostram a transmissão da luz em comprimentos de onda de 400 nm a 950 nm. (g) Mapa falso-RGB do vitral gerado a partir dos espectros de transmissão. (h) Seleção de regiões na imagem com espectros de transmissão semelhante. (i) Espectro de transmissão das regiões selecionados. A figura (j) mostra espectro de transmissão na região do infravermelho e indica que a transmissão da região marcada em amarelo é nulo nesta região. Figura adaptada de [8].

Em paralelo observa-se o surgimento de propostas experimentais para atingir o imageamento hiperespectral em escalas espaciais ainda menores, com ordem de grandeza de microns, já no campo da microscopia. A figura 4a) apresenta um microscópio hiperespectral confocal [9] baseado em elementos de dispersão para aquisição dos espectros e uma imagem hiperespectral obtida de um grupo de organismos unicelulares do gênero *Synechocistes sp.* PCC 6803 [9] (bactérias) marcadas com quatro corantes distintos. De acordo com os autores não foi possível observar diretamente o espectro de emissões dos fluoróforos individualmente em nenhum pixel da imagem, devido à sobreposição espacial dos corantes na amostra menor que o limite de resolução da imagem cada pixel contém mais de uma informação espectral, resultando em uma espécie de soma de espectros mostrado na Figura 4b). Os autores utilizaram um algoritmo computacional para identificar a contribuição da fotoluminescência de cada fluoróforo isoladamente indicada pelas curvas coloridas. O espectro em preto corresponde à soma dessas componentes.

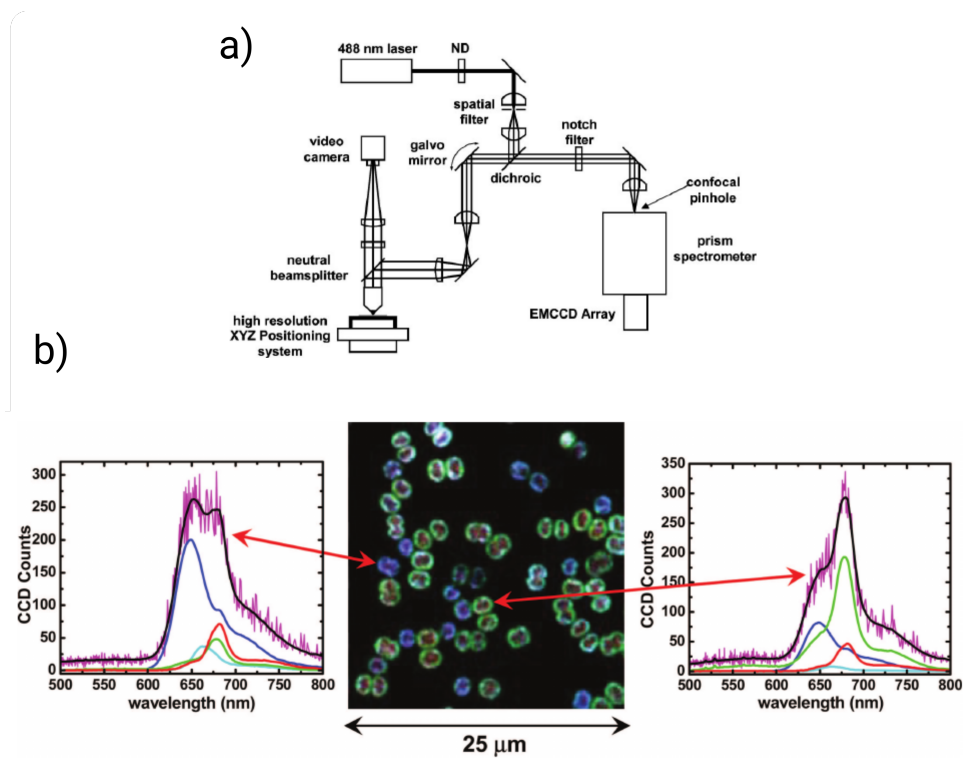


Figura 4 – a) Configuração experimental de um microscópio confocal hiperespectral baseado elementos de dispersão. b) No centro: imagem hiperespectral em cores falsas de uma amostra de organismos celulares marcados com quatro corantes distintos. À esquerda e à direita indicação de espectro de fotoluminescência de regiões selecionadas e o resultado da contribuição da fotoluminescência de cada um dos marcadores fluoróforos. Figura adaptada de [9].

2 Motivação e objetivos

A identificação de assinaturas espectrais de materiais é amplamente utilizada para a classificação e caracterização de amostras. Em materiais biológicos, várias pesquisas investigam a utilização de assinaturas espectrais como ferramenta auxiliar de diagnósticos. Encontra-se na literatura esforços para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem diagnóstico rápido e eficaz. As ferramentas de diagnóstico de tecidos cancerosos, sobretudo o tecido de próstata, baseiam-se na morfologia do microambiente tumoral e o padrão *Gleason* é considerado o padrão ouro dos diagnósticos [10, 11]. Além da morfologia do tecido investigação da fluorescência de cortes histológicos de biópsias se apresenta como uma ferramenta em potencial para o diagnóstico de câncer e pré-câncer [12]. Uma melhor compreensão da fluorescência em tecidos, pode auxiliar a identificação precoce do desenvolvimento de doenças e aumentar as chances de sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes.

Neste trabalho desenvolvemos e utilizamos a técnica de Microscopia Hiperespectral (MH). Investigamos espectros característicos de amostras com resolução espacial da ordem de $10 \mu\text{m}$ e espectros na região de 400 nm a 700 nm. Aplicamos a técnica para imagem de fluorescência e transmissão com a presença de assinaturas espectrais em materiais biológicos. Investigamos a autofluorescência do colágeno e a fluorescência da eosina (corante fluorescente) ligado às fibras de colágeno de cortes histológicos do tecido de próstata.

Na área da Física Básica, a motivação para esse estudo é um melhor entendimento dos princípios de óptica para a formação de imagem e os princípios de interferometria por birrefringência para a obtenção dos espectros. Na área da Física Aplicada a motivação é o desenvolvimento de um microscópio hiperespectral robusto para aplicações em biofotônica. Do ponto de vista interdisciplinar a motivação é a utilização do microscópio como uma das ferramentas para auxiliar no diagnóstico de patologias em seres humanos e outros animais.

Nesta dissertação descreveremos o desenvolvimento de um microscópio customizado com adaptação de módulos de iluminação e um interferômetro por Transformada de Fourier [7] baseado em cristais birrefringentes para análise de materiais biológicos. No capítulo 3 apresentamos uma revisão do fenômeno de birrefringência. No capítulo 4 descrevemos as interações da radiação com as amostras e um método para obter um mapa de Falso-RGB das imagens a partir dos espectros obtidos. No capítulo 5 descrevemos a montagem utilizada e os procedimentos de calibração do MH. No capítulo 6 apresentamos uma descrição das amostras utilizadas e os resultados obtidos são apresentados em seguida no capítulo 7.

3 Espectrômetro baseado em birrefringência

Neste capítulo apresentamos a revisão dos processos ópticos envolvidos na montagem experimental de espectroscopia por Transformada de Fourier baseada em birrefringência. A descrição teórica foi baseada no livro de Peatross e Ware [13].

3.1 Birrefringência

A refração da luz é a mudança na direção de propagação de uma onda eletromagnética que ocorre quando a propagação se dá em dois meios com velocidades distintas.

A figura 5 mostra um diagrama esquemático da propagação da luz em dois meios diferentes, para meios isotrópicos, descritos pela Lei de Snell:

$$n_1 \text{sen}(\theta_i) = n_2 \text{sen}(\theta_t), \quad (3.1)$$

onde n_1 e n_2 são os índices de refração do meio (1) e (2) respectivamente, θ_i é o ângulo de incidência medido em relação à normal a superfície e θ_t representa o ângulo de refração também medido em relação à normal à superfície \hat{N} . O índice de refração é definido como $n = c/v_{\text{meio}}$, onde c é a velocidade de propagação da luz no vácuo e v_{meio} é a velocidade de propagação da luz no meio.

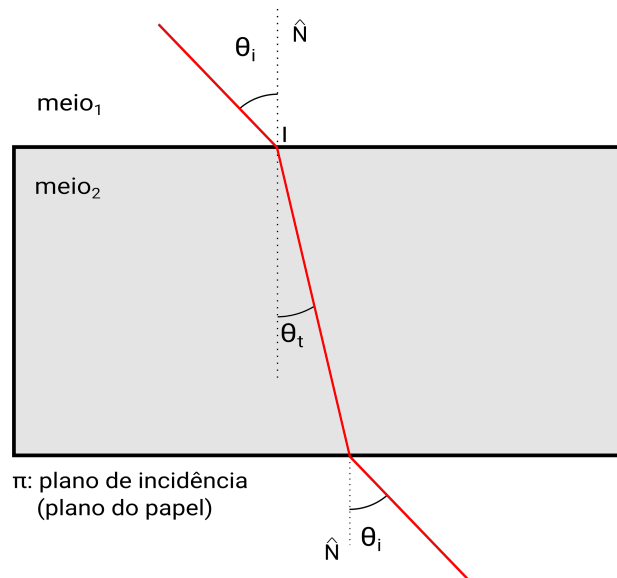


Figura 5 – Refração de um raio luminoso. A direção de propagação do feixe é alterada ao passar do meio 1 para o meio 2. A refração ocorre novamente quando o feixe passa a ser transmitido para fora do meio 2, e o ângulo de transmissão é o mesmo ângulo de incidência.

O índice de refração é portanto uma grandeza adimensional. Em materiais comumente utilizados nos componentes ópticos os valores de n são da ordem de 1,3 a 1,5. A refração é um fenômeno reversível no sentido de que ao invertemos o sentido de propagação dos feixes de luz as trajetórias permanecem inalteradas.

Para materiais anisotrópicos, o índice de refração depende da direção de propagação. Para um mesmo ângulo de incidência, as componentes de polarização do campo elétrico sofrem desvios diferentes como ilustrado na figura 6. Para descrever a birrefringência, adotaremos o referencial do plano de incidência. Nesse referencial (S) representa uma onda eletromagnética cuja polarização é ortogonal (*senkrecht* em alemão) ao plano de incidência e (P) representa uma onda eletromagnética com polarização paralela ao plano de incidência. Com base na Lei de Snell, vemos que para que isso ocorra a velocidade de propagação da luz no meio deve ser diferente para cada componente. Os materiais que possuem anisotropia para o índice de refração da luz são conhecidos como materiais birrefringentes.

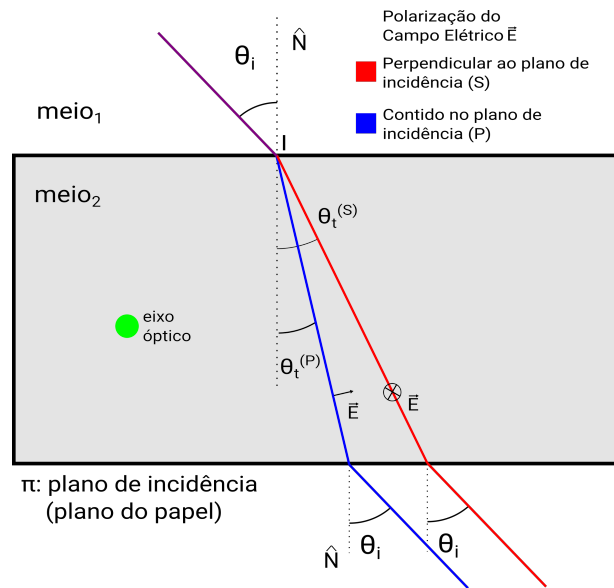


Figura 6 – Birrefringência de um raio luminoso. Para um mesmo ângulo de incidência o feixe transmitido apresenta duas direções de propagação distintas para cada uma das componentes da polarização do campo elétrico em relação ao plano de incidência. A direção do eixo óptico é ortogonal ao plano de incidência, representada pelo ponto verde. A diferença na trajetória dos raios na imagem está representada de maneira exagerada para melhor visualização.

O cristal de α -BBO (BBO - borato de bário) é um exemplo de cristal birrefringente uniaxial. No interior de um material birrefringente uniaxial existe apenas uma direção de propagação em que as duas componentes de polarização (S) e (P) experimentam o mesmo índice de refração, chamado índice de refração ordinário n_o . Essa direção é denominada como *eixo óptico* (*optical axis* em inglês). Em qualquer direção de propagação diferente do eixo

óptico as componentes de polarização viajam em velocidades distintas e a birrefringência é observada. O eixo óptico de um material cristalino depende de propriedades relacionadas à estrutura cristalina do material e pode assumir qualquer orientação relativa aos cortes que determinam a superfície do material utilizado em montagens experimentais. Vamos tratar dos casos em que a orientação do eixo óptico é conhecida tanto em relação ao plano de incidência quanto em relação à superfície do material.

O caso mais simples de birrefringência é quando o eixo óptico é perpendicular ao plano de incidência, como é o caso da figura 6. Nesse caso, as componentes de polarização do feixe refratado experimentam índices de refração distintos e constantes n_o e n_e , uma vez que o ângulo θ entre a componente de polarização (P) e o eixo óptico é sempre 90° independentemente do ângulo de incidência. Nessa configuração a Lei de Snell é válida, ainda que precise ser aplicada separadamente a cada uma das componentes utilizando um índice de refração constante porém diferente para cada uma das componentes. Um dos blocos de cristal birrefringente utilizados na montagem descrita no capítulo 5 utiliza essa orientação do eixo óptico, e uma descrição detalhada da birrefringência no cristal é descrita no Apêndice A. Essa direção de eixo óptico perpendicular ao plano de incidência para um material birrefringente é também utilizada em placas de meia-onda (*placa de $\frac{\lambda}{2}$*) para girar a polarização de um raio de luz que é transmitido através da placa.

Vamos apresentar duas das possíveis orientações do eixo óptico contido no plano de incidência: perpendicular à superfície e paralela à superfície. O primeiro caso é o que ocorre quando o eixo óptico é perpendicular à superfície. O segundo caso, onde o eixo óptico é paralelo a superfície de incidência será apresentado na seção 3.2.

A figura 7 apresenta um cristal birrefringente com o eixo óptico contido no plano de incidência e perpendicular à superfície de incidência. O ângulo entre o vetor $\vec{E}^{(S)}$ que representa a polarização da componente (S) é constante em relação ao eixo óptico. Entretanto o ângulo para o vetor $\vec{E}^{(P)}$, que indica componente de polarização (P), não é constante em relação ao eixo óptico do material. À medida que o ângulo $\theta_t^{(P)}$ varia, o ângulo entre o eixo óptico e a componente de polarização também varia, conforme pode ser visto na figura 6, que indica a orientação da polarização (S) e (P). Essa componente experimenta uma dependência do índice de refração com o ângulo que o vetor $\vec{E}^{(P)}$ forma com o eixo óptico. A dependência angular para o índice de refração é descrita de maneira mais conveniente indicando a dependência com o ângulo θ entre o feixe transmitido e o eixo óptico, através da expressão:

$$n \equiv n_e(\theta) = \frac{n_o n_e}{\sqrt{n_o^2 \sin^2(\theta) + n_e^2 \cos^2(\theta)}}. \quad (3.2)$$

A Lei de Snell usual precisa ser alterada para levar em conta a anisotropia do meio, e deve ser reescrita como:

$$n_1 \sin(\theta_i) = n_e(\theta) \sin(\theta_t). \quad (3.3)$$

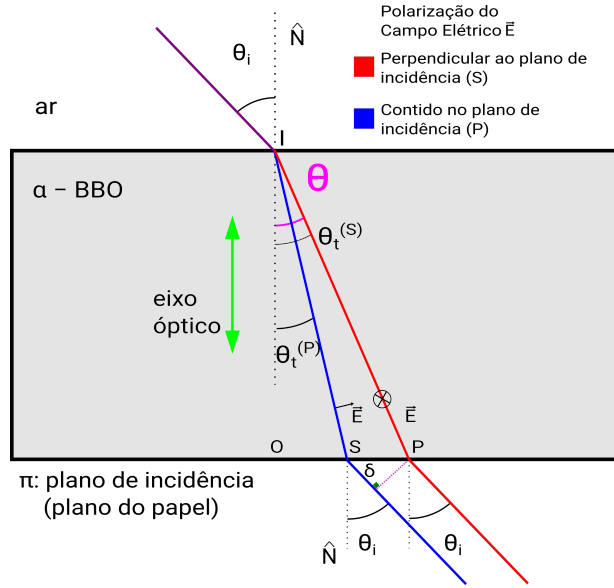


Figura 7 – Birrefringência de um raio luminoso. Na situação em que o eixo óptico do material é perpendicular à superfície (paralelo à normal) o ângulo de transmissão θ_t é o mesmo ângulo θ entre o raio transmitido e o eixo óptico.

Nessa situação, o eixo óptico tem a mesma direção da normal à superfície \hat{N} , conforme indica a figura 7. Usando essa orientação para o eixo óptico simplificamos a notação fazendo com que o ângulo de transmissão θ_t seja o mesmo ângulo θ entre o feixe e o eixo óptico. Tomando $n_1 = n_{ar} = 1$ e substituindo a expressão 3.2 para $n_e(\theta)$ a Lei de Snell modificada assume a forma:

$$\text{sen}(\theta_i) = \frac{n_o n_e}{\sqrt{n_o^2 \sin^2(\theta_t) + n_e^2 \cos^2(\theta_t)}} \text{sen}(\theta_t). \quad (3.4)$$

A expressão para θ_t é obtida através dessa expressão via manipulação algébrica e resulta em:

$$\tan(\theta_t) = \frac{n_e}{n_o} \frac{\sin(\theta_i)}{\sqrt{n_e^2 - \sin^2(\theta_i)}}. \quad (3.5)$$

Através dessas expressões podemos calcular a diferença de fase em função da diferença de caminho entre as componentes (S) e (P) em função do ângulo de incidência em um cristal birrefringente com espessura d . Apresentamos o detalhamento desses cálculos no Apêndice A. A diferença de fase entre as componentes de polarização é dada pela equação A.8:

$$\Delta\phi_{\text{cristal A}} = 2\pi \left\{ \left[\frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S)}}}{\frac{\lambda}{n_o}} + d \text{sen}\theta_i \frac{(\text{tg}\theta_t^{(P)} - \text{tg}\theta_t^{(S)})}{\lambda_{vac}} \right] - \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P)}}}{\frac{\lambda}{n_e(\theta)}} \right\}, \quad (3.6)$$

onde d é espessura do bloco de cristal e λ_{vac} é o comprimento de onda do sinal no vácuo.

3.2 Interferômetro TWINS

Nessa seção descrevemos a utilização de cristais birrefringentes em um interferômetro com partes móveis. O interferômetro TWINS [7, 14], do inglês (*Translating-Wedge-Based Identical Pulses eNcoding System*), é um interferômetro de trajetória compartilhada (do inglês *common-path interferometer*) compacto, estável e resistente à vibrações. Desenvolvido por colaboradores da Universidade Politecnico di Milano e inspirado no compensador de Babinet-Soleil [15], o interferômetro explora a birrefringência do cristal de α -BBO para a geração de réplicas do sinal que se propaga no interior dos cristais. A parte móvel do interferômetro é utilizada para obter um controle fino da diferença de fase entre as réplicas do sinal. O interferômetro TWINS é também utilizado em outros contextos em aplicação de espectroscopia com resolução temporal na região ultravioleta, visível e infravermelho próximo do espectro eletromagnético.

A figura 8 mostra o interferômetro TWINS, composto por dois blocos de cristal birrefringente com os eixos ópticos cruzados e dois polarizadores (P1 e P2). O eixo óptico do bloco birrefringente A é paralelo à superfície de incidência, a mesma situação apresentada na figura 9. O bloco A é cortado em formato de cunha e possui uma parte móvel (indicada pela seta em vermelho) para o controle da espessura do material, como descrito na seção 5.2 onde apresentamos mais detalhes do funcionamento da montagem. O eixo óptico do bloco B é perpendicular ao plano de incidência, mesma situação apresentada na figura 6. O Bloco B introduz uma diferença de fase fixa entre as componentes de polarização (S) e (P) do sinal que se propaga pelo interferômetro. O Bloco A em conjunto com o estágio de translação tem a função de controlar o ajuste fino da interferência entre as componentes. Na posição inicial os blocos A e B têm a mesma espessura $d = 2.4$ mm. Este interferômetro é a base para o espectrômetro por Transformada de Fourier utilizado na câmera hiperespectral e também no microscópio hiperespectral.

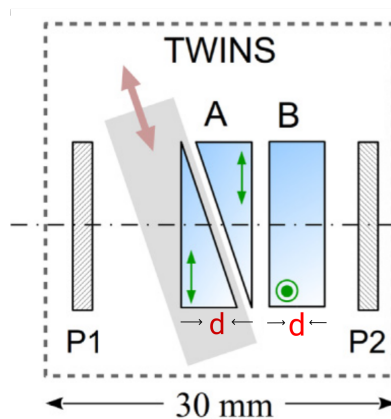


Figura 8 – Interferômetro TWINS baseado em cristais birrefringentes. Cristais birrefringentes com eixos ópticos cruzados e polarizadores na entrada e saída. Figura adaptada de [16]

Na seção 3.1, descrevemos a birrefringência para um cristal com o eixo óptico paralelo ao eixo óptico. Identificamos que o ângulo de refração da componente de polarização (P) $\theta_t^{(P)}$ é o mesmo ângulo θ entre o feixe (P) e o eixo óptico. No caso em que o eixo óptico do material é paralelo à superfície de incidência (perpendicular à normal), conforme indica a figura 9, o ângulo θ entre o feixe transmitido da componente de polarização (P) em relação ao eixo óptico é o ângulo complementar ao ângulo de transmissão θ_t . Apresentamos esse caso com mais detalhes no Apêndice A.

Uma vez identificado que o ângulo entre o eixo óptico e o feixe refratado é o ângulo complementar ao ângulo de transmissão, efetua-se a essa substituição e reescrevemos a expressão 3.2 como sendo:

$$n = n_e(\theta) = \frac{n_o n_e}{\sqrt{n_o^2 \sin^2(90 - \theta) + n_e^2 \cos^2(90 - \theta)}}, \quad (3.7)$$

o que resulta em:

$$n = n_e(\theta) \equiv \frac{n_o n_e}{\sqrt{n_o^2 \cos^2(\theta) + n_e^2 \sin^2(\theta)}} \quad (3.8)$$

Essa expressão para $n_e(\theta)$ é utilizada para o cálculo da diferença de fase entre as componentes de polarização (S) e (P) no bloco de cristal A apresentada no Apêndice A.

A figura 10 mostra a dependência do índice de refração com o ângulo de transmissão para o cristal birrefringente de α -BBO. Os extremos de $n_e(\theta)$ correspondem aos valores de $n_e=1,56$ e $n_o=1,68$. A diferença nos dois casos de orientação do eixo óptico surge pelo fato de que o ângulo θ que é levado em consideração na expressão para $n_e(\theta)$ é o ângulo entre o feixe transmitido e o eixo óptico.

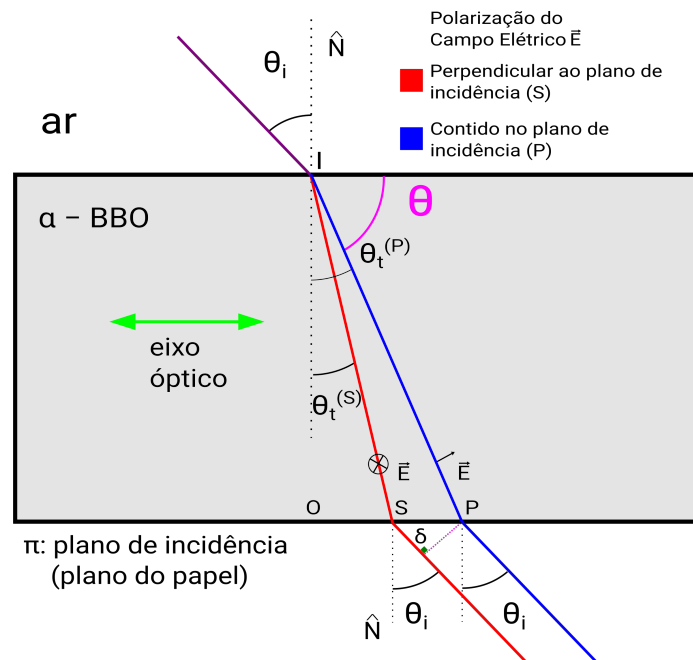


Figura 9 – Birrefringência em um cristal uniaxial negativo (α -BBO). No caso em que o eixo óptico no plano de incidência é paralelo à superfície (perpendicular à normal \hat{N}) o ângulo θ entre o raio transmitido e o eixo óptico é o ângulo complementar ao ângulo de transmissão.

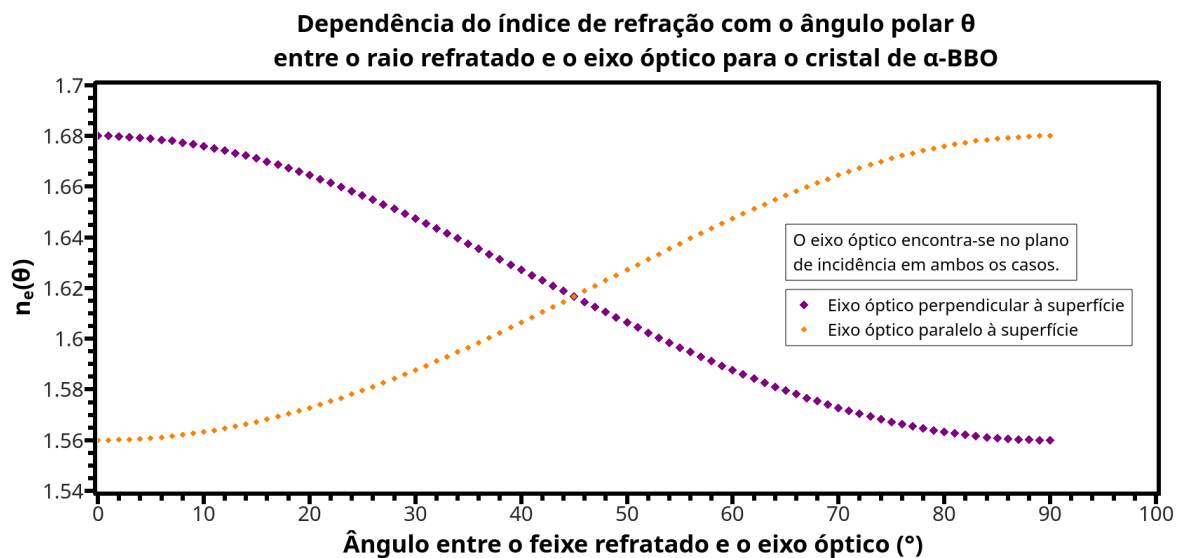


Figura 10 – Dependência do índice de refração com o ângulo de transmissão para um cristal birrefringente negativo em dois casos de orientação do eixo óptico em relação à normal. Para o α -BBO o índice de refração ordinário é $n_o = 1,68$ e o índice de refração extraordinário é $n_e = 1,56$.

A diferença de fase acumulada (descrita com detalhe no ApêndiceA) entre as componentes é dada por:

$$\Delta\phi_{total} = 2\pi \left\{ \left[\frac{d \left(\operatorname{tg}\theta_t^{(P)} - \operatorname{tan}\theta_t^{(S2)} \right) \sin\theta_i}{\lambda_{vac}} + \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P)}}}{\frac{\lambda}{n_e(\theta)}} \right] - \left[\frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S2)}}}{\frac{\lambda}{n_e}} \right] \right\} \quad (3.9)$$

A figura11 apresenta a diferença de fase acumulada entre as componentes (S) e (P) em função do ângulo de incidência na entrada do interferômetro. Os rótulos (S2) e (P2) são utilizados para descrever as componentes de polarização (S) e (P) no cristal B. Os parâmetros utilizados para o cálculo da diferença de fase estão indicados na figura. Para esses cálculos a espessura d do cristal móvel foi mantida fixa com o valor da espessura inicial $d = 2.4$ mm.

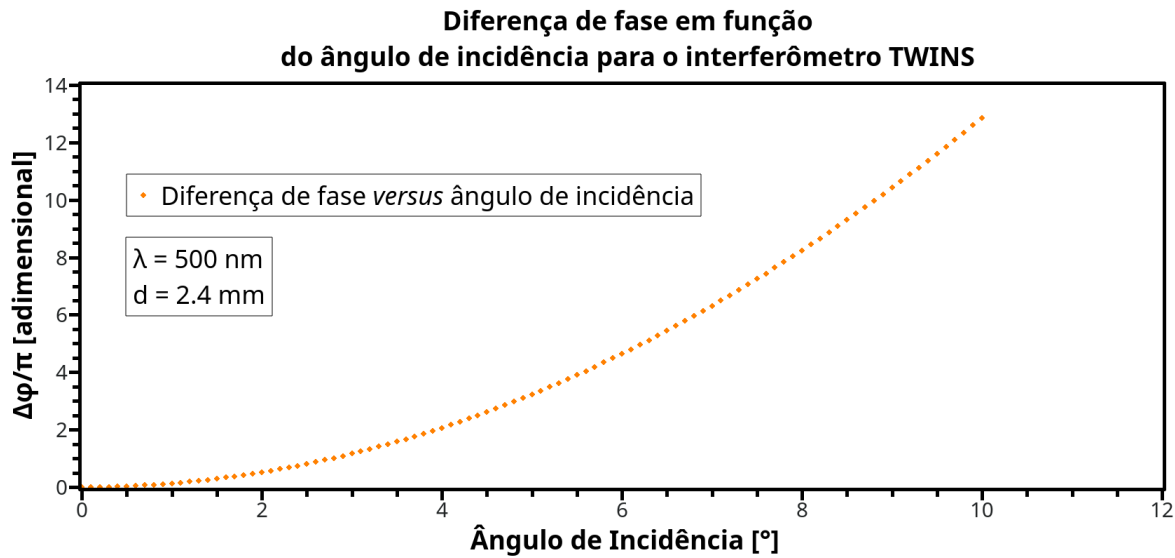


Figura 11 – Diferença de fase em função do ângulo de incidência para um cristal birrefringente.

No interferômetro TWINS um polarizador é posicionado a 45° na entrada. A diferença do índice de refração para as componentes (S) e (P) da luz transmitida pelo cristal é responsável pela geração das réplicas do sinal que propaga. As réplicas do sinal com polarização ortogonal (S) e (P) do sinal são combinadas novamente no polarizador da saída também a 45° . Através do controle da espessura d de um dos blocos birrefringentes do interferômetro através movimentação de uma das cunhas utilizando um estágio de translação.

4 Fotoluminescência e outras fontes de luz

Luminescência é o nome geral dos processos físicos de emissão de luz proveniente da relaxação de energia dos elétrons em estados eletrônicos excitados de uma substância. Por razões históricas a luminescência é dividida em categorias de acordo com os processos de excitação dos estados eletrônicos.

A fotoluminescência (PL do inglês *photoluminescence*) é a emissão de luz cuja fonte é um material excitado por radiação eletromagnética (luz). Os elétrons são promovidos para estados eletrônicos excitados através da absorção de fótons com energia equivalente a diferença de energia ΔE entre o estado fundamental e o estado excitado. A radiação emitida pela amostra é proveniente da relaxação dos elétrons para estados de menor energia através da emissão de fótons.

A PL é formalmente dividida em dois processos:

- Fluorescência: Emissão de luz de partir da relaxação de um estado singlete. Os elétrons excitados têm spin oposto aos elétrons do estado final.
- Fosforescência: Emissão de luz a partir da relaxação de um estado tripleto. Os elétrons excitados têm o mesmo spin do estado fundamental.

Na figura 12 vemos a representação do estado fundamental (S_0) de um material — uma molécula, por exemplo — e o seu nível excitado singlete, estados com spin $\frac{1}{2}$ (S_1) e tripleto, estados com spin $\frac{3}{2}$ (T_1). As barras horizontais representam a energia de cada estado e a distância entre os níveis é proporcional à diferença de energia ΔE que os separa. Inicialmente no estado fundamental o nível excitado é atingido através da absorção de um fóton com energia equivalente à diferença de energia entre os níveis. A excitação por absorção de um fóton é representada pelas setas para cima. Após a excitação a molécula retorna ao estado energético inicial emitindo um fóton (representado pelas setas para baixo) ou por processos não-radiativos (indicados pelas linhas onduladas).

Devido às regras de seleção envolvendo a paridade de spin dos elétrons dos diferentes níveis eletrônicos, tipicamente as emissões de fluorescência e fosforescência ocorrem em escalas de tempo diferentes, com $\tau_{fluor} \approx 10^{-9}$ s e $\tau_{fosf} \approx 10^{-3} - 1$ s. Essa diferença no tempo médio de relaxação atribui a alguns materiais fosforescentes o aspecto de “brilho no escuro”, onde a emissão proveniente continua após o término da excitação. Os demais processos que dão origem à emissão de luz através de estados eletrônicos excitados são classificados de acordo com a natureza da interação que promove a excitação. A quimioluminescência e bioluminescência são exemplos de situações em que a energia proveniente para promover os estados excitados é proveniente de reações químicas.

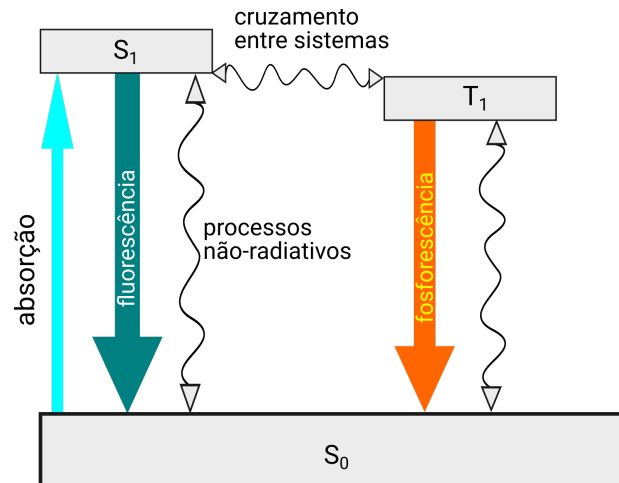


Figura 12 – Diagrama de Jablonski simplificado. A figura indica os níveis de energia e a excitação através de um fóton. A relaxação para o estado fundamental pode ocorrer por processos radiativos e não-radiativos. Figura adaptada de [17].

4.1 Fluorescência das amostras e fontes de excitação

A radiação eletromagnética é amplamente empregada para estudo de materiais biológicos, principalmente células e tecidos. Embora a aplicação mais comum da radiação eletromagnética seja a iluminação das amostras, é possível utilizar a luz como ferramenta de estudos quantitativos em amostras biológicas, em especial para obter uma caracterização em termos da assinatura espectral desses materiais.

A autofluorescência de um material biológico é a fluorescência proveniente das amostras (tecidos ou células) sem a presença de marcadores ou corantes fluorescentes. Na literatura encontramos exemplos de tecidos e células que quando excitados respondem muito bem no sentido de que a emissão da autofluorescência é suficiente para realização de imagens e análises quantitativas do sinal emitido.

A figura 13b) apresenta o espectro de autofluorescência do colágeno [18] presente em tecido biológico quando excitado em comprimentos de onda distintos entre 355 nm e 473 nm. A figura 13a) apresenta a autofluorescência do estroma, indicando uma semelhança com a autofluorescência do colágeno. Isso indica que a autofluorescência do colágeno é predominante na região do estroma, a parte responsável pela estrutura e junção do tecido devido a grande quantidade de colágeno no estroma. Uma exceção para a semelhança dos espectros é observada para a excitação em 355 nm onde a autofluorescência da região de estroma apresenta um *ombro* que não é observado na autofluorescência do colágeno excitado com o mesmo comprimento de onda. Ainda com relação à figura 13b), nota-se o pico da autofluorescência do colágeno em torno de $\lambda_{pico} \approx 540$ nm para a excitação centrada em 473 nm.

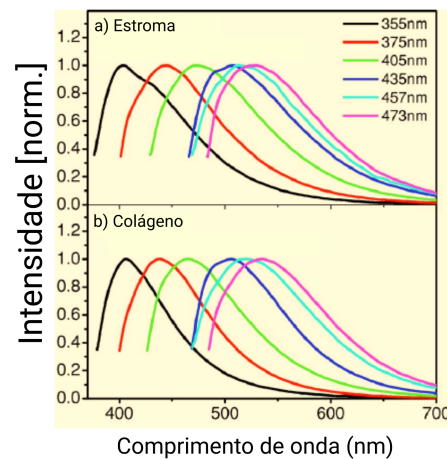


Figura 13 – a) Autofluorescência do estroma de tecido biológico e b) autofluorescência do colágeno em tecido biológico para excitações entre 335 nm e 473 nm. Figura adaptada de [18].

Diversos materiais biológicos de grande interesse de estudo apresentam fluorescência nas bandas espectrais amplamente utilizadas em experimentos, especialmente na região do visível e infravermelho próximo. Por esse e outros motivos relacionados principalmente com a estabilidade das amostras, um artifício utilizado para fins de estudo de tecidos biológicos é a aplicação de corantes (*dyes*) que por sua vez respondem de maneira eficiente à radiação eletromagnética incidente. Há dois aspectos dos corantes utilizados como marcadores biológicos que são amplamente explorados, o primeiro deles é que há corantes específicos para marcação de determinadas substâncias tornando possível a distinção de regiões de uma mesma amostra.

A eosina (E) por exemplo é uma coloração fluorescente utilizada como marcador para fibras de colágeno e citoplasma das células. A hematoxilina (H) é uma coloração utilizada para marcar o núcleo de células. A coloração *H&E* (hematoxilina e eosina) é utilizada para identificar separadamente as células e o tecido extracelular em cortes histológicos por identificação visual ou através da fluorescência dos marcadores. A figura14 apresenta uma imagem de microscopia de tecido biológico corado com os com *H&E* mostrando a separação do núcleo em roxo e o citoplasma em uma tonalidade rosa. A figura15 apresenta uma comparação entre as imagens de microscopia de autofluorescência de um tecido biológico não corado e o mesmo tecido biológico corado com H&E.

A segunda característica dos corantes é que eles possuem assinaturas espectrais características, sendo distinguíveis através da análise dos espectros de fluorescência. Essas duas características combinadas tornam os corantes atrativos para aplicações no imageamento hiperespectral, uma vez que auxiliam tanto na melhora da emissão de fluorescência quanto na diferenciação dos tecidos no imageamento por transmissão.

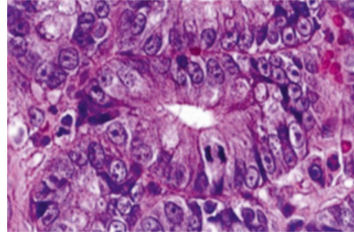


Figura 14 – Imagem de microscopia de um tecido biológico corado com hematoxilina e eosina (*H&E*). Figura retirada de de [19].

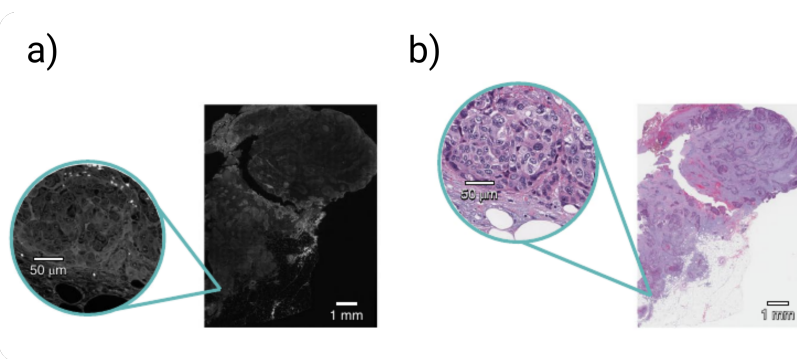


Figura 15 – a) Imagem de autofluorescência de um tecido biológico e b) o tecido biológico corado com hematoxilina e eosina (*H&E*). Figura adaptada de [20].

A figura 16 apresenta uma imagem hiperespectral de esferas de diâmetro de aproximado de $2 \mu\text{m}$ marcadas com cinco corantes distintos. Para excitar diferentes amostras em ambos os casos (autofluorescência do material biológico ou fluorescência do corante específico para marcação) é necessária a utilização de uma fonte de luz adequada principalmente em três aspectos; quanto a banda espectral, quanto a intensidade luminosa e quanto ao perfil de intensidade da fonte. Esses aspectos são apresentados nas seções seguintes.

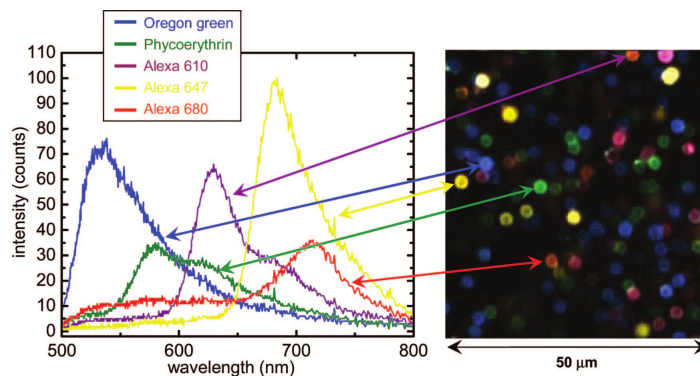


Figura 16 – Imagem de microscopia hiperespectral de esferas com diâmetro aproximado de $2 \mu\text{m}$ coradas com cinco corantes fluorescentes distintos. Em detalhe a fluorescência de cada um dos corantes utilizados. Figura retirada de [9].

4.2 Luminosidade de um fonte de luz $I_0(\lambda)$

A Luminosidade de uma fonte $I_0(\lambda)$ é uma função que representa a taxa de fótons emitidos por unidade de tempo para cada comprimento de onda. A quantidade de fótons emitidos em cada comprimento de onda é uma característica tanto da potência da fonte luminosa quanto do material que constitui a fonte. As figuras[17][18] apresentam curvas de luminosidade para algumas fontes de luz. A figura[17] apresenta emissões de fontes distintas cuja emissão se dá em bandas espectrais largas cobrindo toda a região do visível. A figura[18] apresenta fontes de diodos emissores de luz conhecidos como LEDs (do inglês *Light Emitting Diode* cuja emissão se dá em bandas estreitas centradas em torno do máximo sendo consideradas fontes aproximadamente monocromáticas.

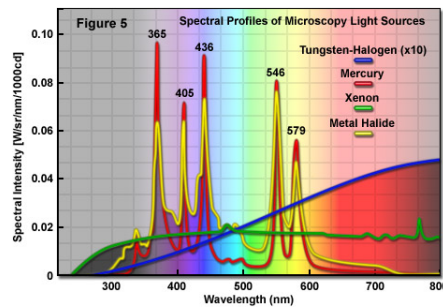


Figura 17 – Intensidade luminosa $I_0(\lambda)$ para algumas das fontes de luz utilizadas em microscopia óptica. Figura retirada de de [21].

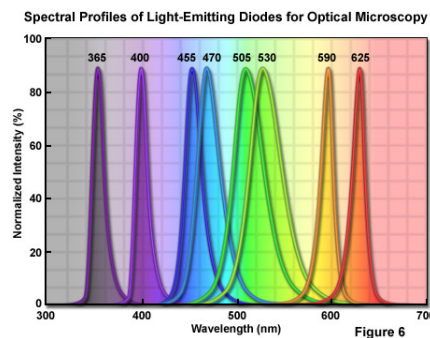


Figura 18 – Intensidade luminosa $I_0(\lambda)$ para fontes de LED. Em detalhe os picos em comprimento de onda da emissão. Figura retirada de [21].

As fontes luminosas de diversos tipos tanto de espectro contínuo (lâmpadas incandescentes, por exemplo) de espectros discretos (lâmpadas de gases rarefeitos) e fontes aproximadamente monocromáticas (*lasers* e LED) onde a radiação emitida compreende uma faixa estreita em torno de um máximo são escolhidas de acordo com o tipo de experimento que se pretende realizar bem como as amostras que serão analisadas.

4.3 Interação da iluminação com as amostras

No processo de obtenção de cores em falso-RGB descrito na seção 4.4, para simplificar a descrição do método, sem perda da generalidade, vamos tratar a amostra como uma fonte de luz sem fazer referência aos processos que dão origem à luz emitida, entretanto indicaremos alguns processos relevantes para o estudo das amostras. Conforme indica a figura 19, temos três possibilidades para a radiação incidente sobre a amostra: reflexão, absorção e transmissão.

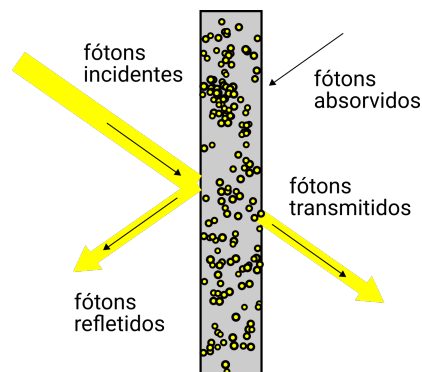


Figura 19 – Radiação incidente em um objeto. Três possibilidades para os fótons incidentes: reflexão, absorção e transmissão. Figura adaptada de [22].

Outros sinais provenientes da interação da radiação com as amostras são, por exemplo, a fluorescência emitida a partir da relaxação da energia dos elétrons em estados eletrônicos excitados pelos fótons absorvidos da fonte de iluminação. Esses sinais contribuem para o processo de formação da imagem e os espectros observados.

Passaremos a uma descrição desses processos nas próximas seções.

4.3.1 Refletância de uma amostra $R(\lambda)$

A Refletância $R(\lambda)$ de uma amostra é a razão entre as intensidades da radiação refletida I_R e da radiação incidente I_0 para um dado comprimento de onda λ .

$$R(\lambda) = \frac{I_R(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (4.1)$$

A refletância é portanto uma grandeza adimensional que pode ser representada como uma porcentagem, onde 1 indica o limite ideal em que a radiação é totalmente refletida e 0 indica que nenhuma radiação é refletida.

A análise pode ser simplificada levando em consideração o caso em que a radiação incidente não é transmitida através do objeto (corpos opacos). Nesse caso existem duas

possibilidades para a radiação incidente sobre a amostra; a radiação é absorvida pela amostra ou refletida. O número de fótons refletidos e absorvidos pela amostra em cada comprimento de onda é igual ao número de fótons emitido pela fonte.

4.3.2 Luminosidade Refletida $I_R(\lambda)$

A luminosidade refletida $I_R(\lambda)$ de uma amostra é a intensidade da radiação refletida para cada comprimento de onda. A função $I_R(\lambda)$ é o resultado do produto $I_0(\lambda) \times R(\lambda)$, conforme mostra a figura 20. É portanto uma curva intimamente relacionada com a função $I_0(\lambda)$ da fonte de luz, uma vez que a refletância para um dado comprimento de onda é característica da amostra. Portanto a função $I_R(\lambda)$ geralmente é diferente para a mesma amostra quando iluminada por fontes distintas de luz.

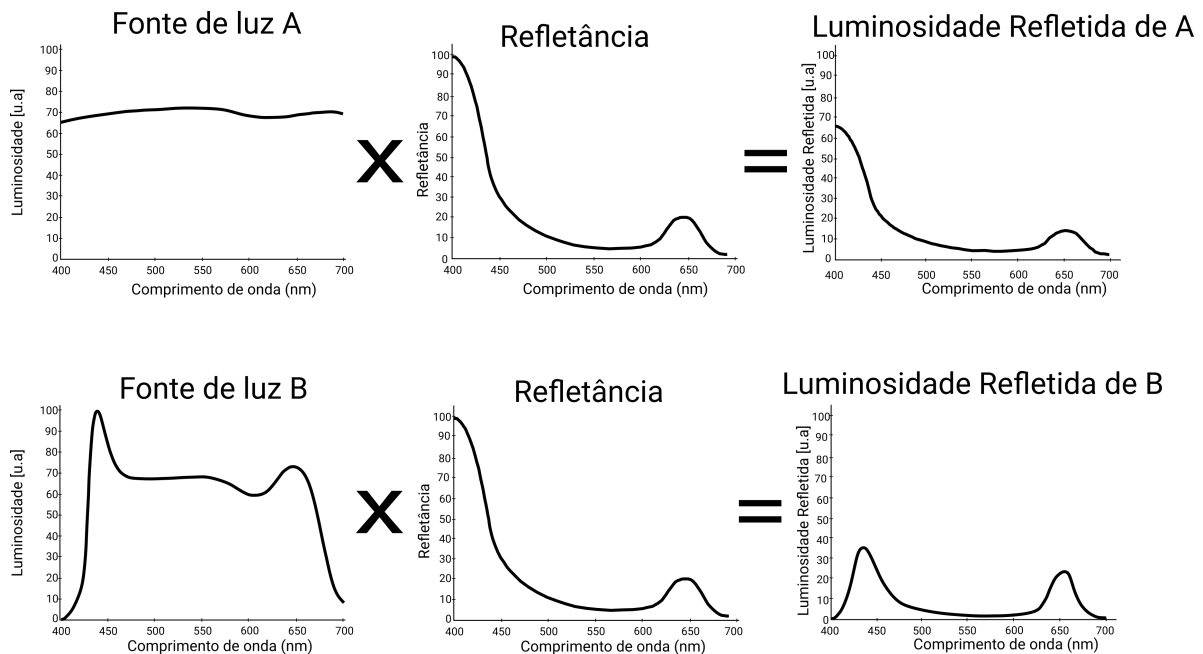


Figura 20 – Interação de duas fontes luminosas distintas com o mesmo objeto em situações independentes. A Luminosidade refletida $I_R(\lambda)$ é diferente para os dois casos. O mesmo objeto apresenta coloração distinta em cada situação. Figura adaptada de [22].

4.3.3 Transmitância $T(\lambda)$

A Transmitância $T(\lambda)$ de uma amostra é a razão entre as intensidades da radiação transmitida I_T e da radiação incidente I_0 para um dado comprimento de onda λ . Em analogia à refletância, a transmitância é também uma grandeza adimensional que pode ser representada como uma porcentagem, onde 1 indica o limite ideal onde a radiação é totalmente transmitida e 0 indica que nenhuma radiação é transmitida através da amostra (corpo opaco).

$$T(\lambda) = \frac{I_T(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (4.2)$$

4.3.4 Absorbância $A(\lambda)$

A absorbância $A(\lambda)$ por sua vez é uma medida da capacidade de um material de absorver a radiação em um dado comprimento de onda. Para amostras onde o espalhamento da luz incidente é pequeno comparado com a absorção, a absorbância pode ser definida como a razão entre a intensidade da radiação incidente sobre a amostra e a radiação transmitida.

$$A(\lambda) = -\log_{10} \frac{I_T(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (4.3)$$

4.4 Obtendo cores através de espectros

Nessa seção apresentamos um método [22] de obtenção de cores através de espectros de luz proveniente das amostras. Esse método é em certo modo similar à forma como o olho humano percebe cores a partir da luminosidade observada em um objeto. A percepção de cores pelo olho humano se dá através da composição de três cores primárias do sistema RGB: vermelho(R), verde(G) e azul(B) com intensidades diferentes. A intenção é obter uma forma de representar as cores da imagem de uma amostra utilizando o padrão de cores por adição RGB de maneira semelhante ao olho humano a partir de uma imagem hiperespectral das amostras.

Chamamos de luz visível a faixa do espectro eletromagnético cujo olho humano é sensível. Essa faixa é compreendida entre os comprimentos de onda de 400 nm e 700 nm. Os cones são estruturas celulares presentes na cavidade intraocular responsáveis pela detecção de luz capazes de discriminar o comprimento de onda incidente. Existem três tipos de cones e cada um deles é sensível a uma região da radiação visível. A Figura 21 apresenta a curva de sensibilidade dos cones como uma função do comprimento de onda da radiação incidente [23]. De acordo com a figura 21 vemos que os picos de sensibilidade de cada cone estão localizados em $\lambda_{azul} = 420$ nm, $\lambda_{verde} = 534$ nm e $\lambda_{vermelho} = 564$ nm. Uma inspeção na curva de sensibilidade dos cones mostra que com apenas três cones não é possível detectar fótons pelo comprimento de maneira eficiente por duas razões: existem apenas três canais (RGB) e esses canais são sobrepostos. Apesar disso, o olho humano é capaz de identificar uma elevada quantidade de cores.

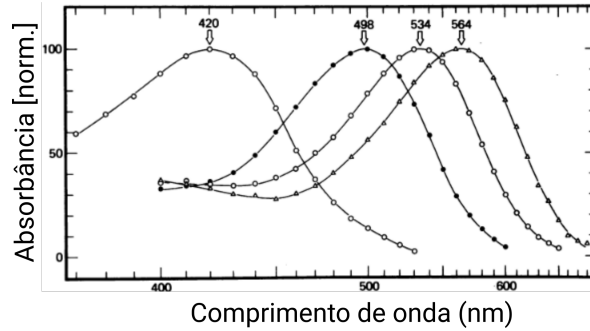


Figura 21 – Absorbância das quatro estruturas celulares do olho humano responsáveis pela percepção de luminosidade e cores. Três das estruturas são responsáveis pela percepção de cor (cones) e tem picos $\lambda_{azul} = 420\text{nm}$, $\lambda_{verde} = 534\text{nm}$ e $\lambda_{vermelho} = 564\text{nm}$. Ao centro a estrutura responsável pela percepção de luminosidade (bastonete) com pico em $\lambda_{bast} = 498\text{nm}$. Adaptado de [23]. Figura adaptada de [23].

A resposta de cor de uma amostra é uma função resultante do produto das funções $I_R(\lambda) \times S_{cone_i}(\lambda)$, onde $S_{cone_i}(\lambda)$ é a função sensibilidade para cada um dos cones onde i indica o cone R, G ou B. A intensidade do Azul é proporcional à área sobre a curva de resposta do cone azul e o mesmo é válido para as demais cores. Com três tipos de cone com sensibilidades diferentes na região do visível é possível uma percepção de um elevado numero de cores na região do visível. De maneira complementar, com fontes de luz nas cores RGB com controle da intensidade relativa de cada uma das fontes é possível produzir diversas cores.

Simulando as curvas de sensibilidade para os cones azul, verde e vermelho, obtemos um método para reproduzir as cores de uma amostra tendo como ponto de partida a luminosidade refletida $I_R(\lambda)$. É possível recriar as cores de uma imagem monocromática se temos disponível a função $I_R(\lambda)$ para cada pixel da amostra. Esse método utiliza apenas as cores RGB com intensidades diferentes para gerar diversas cores. A quantidade de cores possíveis de ser geradas em um sistema RGB de cores é dada pelo produto das intensidades diferentes que cada cor primária R, G e B pode ser emitida. Por exemplo, se cada cor primária pode assumir 256 valores de intensidade, onde cada intensidade representa um “tom” da cor primária (0 representa a menor intensidade possível - nenhum sinal é emitido - e 255 representa a maior intensidade emitida), o número de cores N_{cores} diferentes possíveis de serem geradas é dada pelo produto das intensidades individuais de cada uma das cores primárias:

$$N_{cores} = N_R N_G N_B = 256^3 = 16.777.216$$

Embora todas essas cores sejam distintas uma das outras em termos da intensidade relativa das cores primárias pode ocorrer o caso de algumas delas serem indistinguíveis por um observador humano.

5 Microscópio Hiperespectral

O Microscópio Hiperespectral é um instrumento utilizado para obter em conjunto uma imagem com resolução espacial elevada e o espectro de cada pixel da imagem. A configuração implementada neste trabalho consiste em um microscópio customizado — também referido como microscópio caseiro — e um espectrômetro por Transformada de Fourier (ETF) utilizando cristais birrefringentes.

5.1 Microscópio

A montagem do microscópio customizado consiste em uma objetiva, uma lente de zoom com comprimento variável e uma câmera para a captura da imagem. A objetiva e a lente de zoom em conjunto são responsáveis pelo aumento da imagem e a câmera tem papel análogo ao do observador. A figura22 apresenta a configuração do microscópio hiperespectral. Essa montagem foi desenvolvida em colaboração com Bárbara Elza N. de Faria durante o seu doutorado na Universidade Federal de Minas Gerais e na Politecnico di Milano e compõe a sua tese de doutoramento [24].

Em nossa montagem utilizamos como lente de tubo do microscópio a lente de câmera fotográfica da fabricante Nikon, modelo AF Zoom-NIKKOR 70 mm-300 mm. A utilização dessa lente apresenta uma vantagem em relação a uma lente de distância focal fixa devido ao fato da estrutura que protege as lentes e controla o comprimento do tubo contribuir para isolar fontes de luz do laboratório não desejáveis que interferem no imageamento. Uma desvantagem da utilização da lente de zoom é que o aumento da imagem não é fixo devido aos diferentes ajustes de distância focal que podem ser utilizados na lente. O posicionamento da objetiva em relação à lente de zoom é feita conforme a figura22 e a escolha da objetiva e do comprimento do tubo são feitos de acordo com o aumento adequado e a formação de uma imagem nítida para observação das amostras. O aumento M fornecido pela conjugação das lentes é dado pela equação

$$M = \frac{f_{zoom}}{f_{objetiva}} = \frac{l_i}{l_o}, \quad (5.1)$$

conhecida como equação de aumento. O aumento da imagem de um objeto é uma grandeza adimensional e equivale a razão entre o tamanho da imagem do objeto l_i e o tamanho do objeto l_o . A distância focal da objetiva é $f_{objetiva}$ e f_{zoom} é a distância focal variável da lente de zoom.

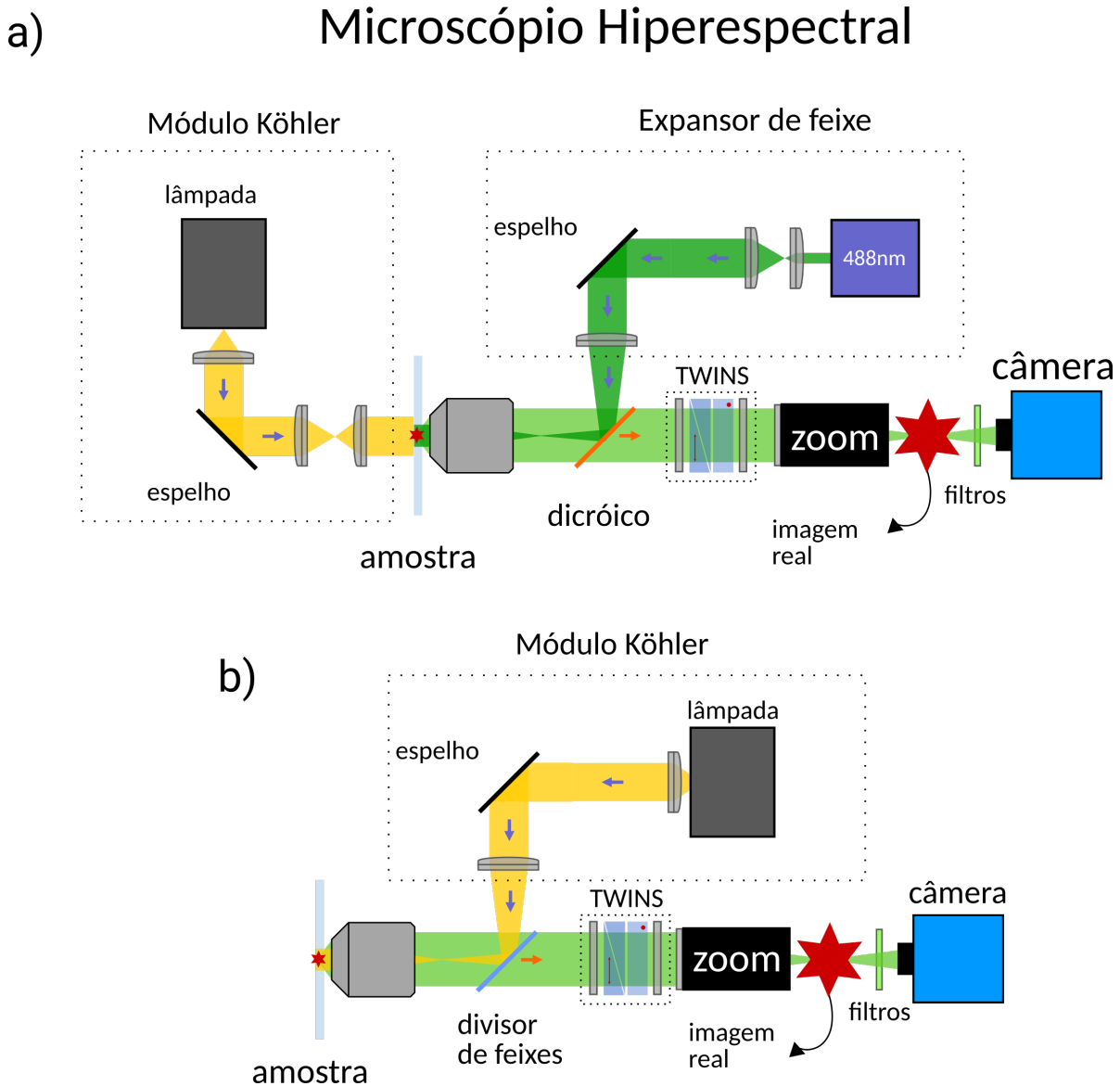


Figura 22 – Configuração do microscópio hiperespectral. Braços de iluminação Köhler em transmissão e laser em reflexão em (a) e reflexão em (b) para a iluminação Köhler. Interferômetro TWINS no braço de imageamento entre a objetiva e a lente de zoom. Para a iluminação em reflexão a objetiva é um elemento comum do sistema de iluminação e imageamento. Em b) a objetiva atua como lente condensadora.

Uma das maneiras de se alterar a aumento do microscópio é variando o f_{zoom} da lente de zoom. A outra forma é a troca da objetiva. Este processo de formação de imagem é semelhante ao utilizado nos microscópios comerciais onde a imagem é formada pela conjugação da objetiva do microscópio com uma lente de distância focal fixa.

Para os nossos experimentos, utilizamos, na entrada da câmera, a lente macro de máquina fotográfica da fabricante Nikon, modelo AF Micro-Nikkor 60 mm. Essa lente é necessária pois o microscópio customizado é aberto e assim a luz espalhada da fonte de iluminação e outras fontes externas se sobrepõem a iluminação coletada da amostra.

Algumas adaptações na montagem foram feitas para diminuir a contribuição das fontes de luz indesejáveis durante o imageamento e as lentes de máquina fotográfica foram umas delas.

Utilizando essa configuração de lentes, observa-se a formação de uma imagem real no plano focal anterior da lente da câmera. A imagem real formada pela conjugação de lentes do microscópio serve de objeto para a câmera monocromática. A lente da câmera também produz um aumento efetivo no processo de formação da imagem, de modo que o aumento total é diferente do obtido utilizando apenas dois conjuntos de lentes. A calibração para obter as escalas das medidas e a resolução espacial das imagens é descrita na seção 5.4

A figura 23 apresenta em detalhe as objetivas utilizadas para o imageamento hiperespectral e a vista lateral do braço de imageamento da montagem do microscópio sobre a mesa óptica. Utilizamos objetivas de microscópio do fabricante OLYMPUS, da série LUCPlanFLN, com aumento nominal (isto é, quando utilizadas no microscópio do fabricante) de $20\times$, $40\times$ e $60\times$. A figura 23a) apresenta a objetiva de aumento de $20\times$, a figura 23b) apresenta a objetiva de aumento de $40\times$ e na figura 23c) a objetiva de $60\times$ de aumento. A figura 23d) apresenta a fotografia da montagem.

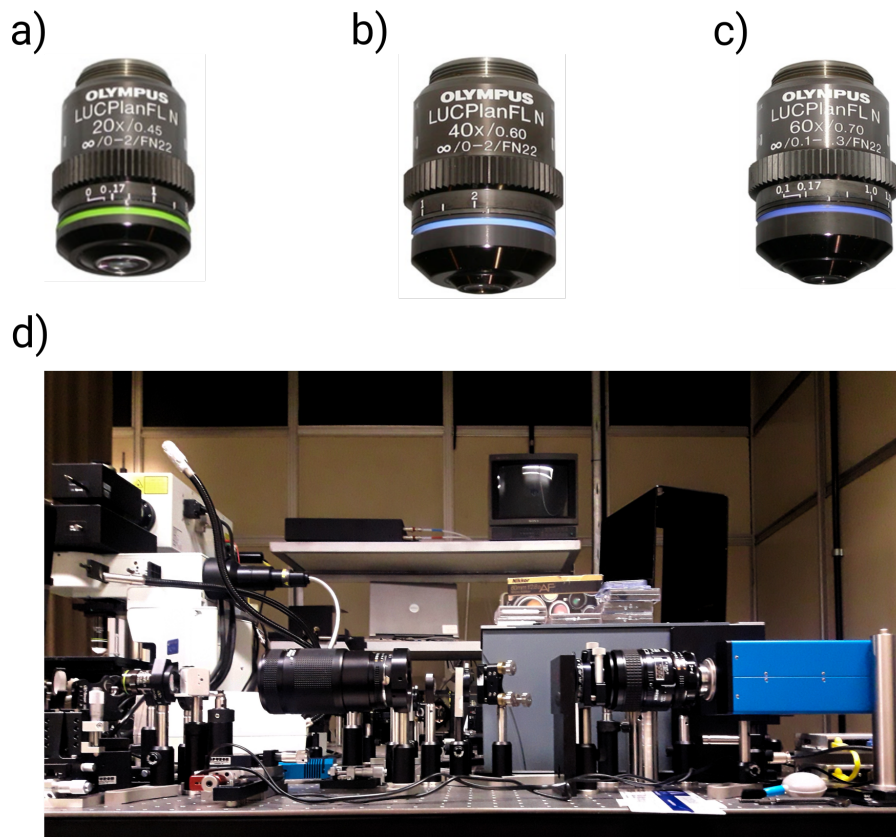


Figura 23 – As figuras (a), (b) e (c) apresentam as objetivas utilizadas para o imageamento hiperespectral. A figura d) apresenta uma fotografia da montagem no laboratório.

5.2 Interferômetro

Nesta montagem utilizamos um ETF desenvolvido e patenteado por um grupo de colaboradores da Universidade Politecnico di Milano (POLIMI). O ETF é baseado em cristais birrefringentes com partes móveis em formato de cunha (*wedge*) conforme indica a figura 24 montadas em um estágio da translação e dois polarizadores com os eixos cruzados. Esse interferômetro é referenciado na literatura como *TWINS*, do inglês (*Translating-Wedge-Based Identical Pulses eNcoding System*) [7, 14].

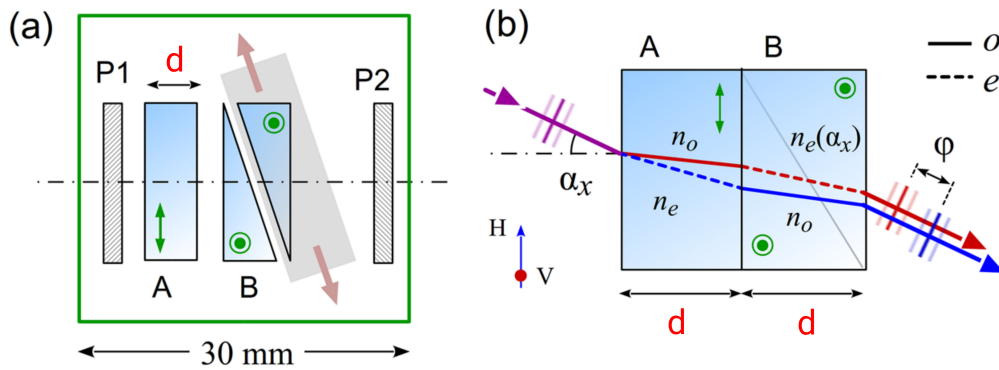


Figura 24 – a) Interferômetro baseado em cristais birrefringentes. Cristais birrefringentes de α -BBO são utilizados para gerar réplicas do sinal de emissão das amostras. Os polarizadores são utilizados para definir a orientação da polarização da luz na entrada e combinar o sinal na saída garantido a interferência entre as réplicas. b) Caminhos percorridos pelas duas componentes de polarização nos cristais e a diferença de fase entre as réplicas dos sinal. A diferença de fase é controlada pela espessura do cristal através do deslocamento da cunha. Figura adaptada de [16].

A figura 24 mostra a configuração dos polarizadores e cristais birrefringentes que compõem o ETF TWINS. Em relação à figura 24 as setas e pontos em verde indicam a orientação do eixo óptico de cada bloco. Os vetores H (Horizontal) e V (Vertical) indicam a polarização do campo elétrico de cada uma das réplicas do sinal em relação ao referencial do laboratório. Na montagem utilizada o interferômetro foi posicionado entre a lente de zoom e a objetiva, conforme indica a figura 22

O polarizador na entrada do ETF é posicionado a 45° . A figura 24 apresenta os elementos que compõem o interferômetro. Dois blocos A e B feitos de α -BBO, um material cristalino que apresenta birrefringência. Um material birrefringente possui eixos com diferentes velocidades de propagação da luz em seu interior, como descrito na seção 3.1. Um dos blocos (bloco B da figura) introduz uma diferença de fase entre as réplicas do sinal. Como o campo elétrico se propaga com velocidades diferentes devido à anisotropia do meio as réplicas do sinal com polarização (S) e (P) possuem um atraso relativo em função do percurso, o que leva a uma diferença de fase entre as componentes em função da diferença de caminho óptico, como mostrado no Apêndice A.

Como os blocos de cristais birrefringentes têm orientações cruzadas a diferença de caminho óptico das componentes é diferente em cada bloco, pois o sinal que viaja mais rápido no primeiro cristal viaja mais lentamente no segundo cristal e vice-versa. A figura 25 mostra em detalhes o formato de cunha feito no bloco B do cristal para o controle fino do atraso relativo entre as componentes. Uma vez que os blocos de cristal tem a mesma espessura, a posição inicial não apresenta atraso entre as componentes do sinal que incidem com $\theta_i = 0^\circ$. À medida que uma das cunhas do bloco de cristal se desloca em relação à outra, como mostra a figura 25, um atraso relativo entre as componentes do campo elétrico do sinal que se propaga através do interferômetro é observado. O polarizador na saída do cristal também a 45° combina novamente as réplicas com polarização cruzada em um único sinal polarizado.

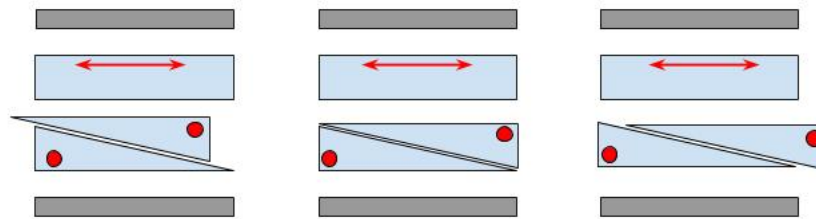


Figura 25 – Interferômetro baseado em cristais birrefringentes. Cristais birrefringentes de α -BBO são utilizados para gerar réplicas do sinal de emissão das amostras. Os polarizadores são utilizados para definir a orientação na entrada e combinar o sinal na saída garantido a interferência entre as réplicas. A diferença de fase é controlada pela espessura do cristal através do deslocamento da cunha.

No apêndice A, descrevemos a birrefringência utilizando o referencial do plano de incidência que é independente do referencial do laboratório. Nesse caso a componente H - horizontal no referencial do laboratório - corresponde à polarização (P) (paralela ao plano de incidência) e a polarização V - vertical no referencial do laboratório - corresponde à polarização (S) (perpendicular ao plano de incidência).

À medida que uma das cunhas se movimenta com passos controlados por um estágio de translação, imagens da amostra no plano focal do microscópio são capturadas (uma para cada posição da cunha) e um padrão de máximos e mínimos de intensidade para cada pixel da imagem é observado. Cada pixel da imagem tem um interferograma associado a ele e o espectro do pixel é obtido através da Transformada de Fourier do interferograma. Um experimento típico utilizando o MH consiste em capturar uma série de imagens monocromáticas da amostra — uma imagem para cada posição da cunha, como mostra o exemplo da Figura 26. Do ponto de vista da configuração espacial dos objetos da amostra (células, tecidos, fibras, marcadores fluorescentes, etc) as imagens são idênticas exceto pela intensidade luminosa dos pixels de cada imagem, que se alteram devido às interferências construtivas e destrutivas que ocorrem devido ao interferômetro baseado em cristais birrefringente. Podemos pensar nos dados experimentais como um cubo, onde a

face representa a imagem do plano da amostra e a profundidade contém um interferograma de cada pixel da amostra.

Um conjunto de *softwares* desenvolvidos por colaboradores do projeto é utilizado para tratar os dados e obter o espectro via Transformada de Fourier dos pixels das regiões de interesse. O processo de tratamento das imagens para obtenção dos espectros via Transformada de Fourier é descrito na seção 5.5.

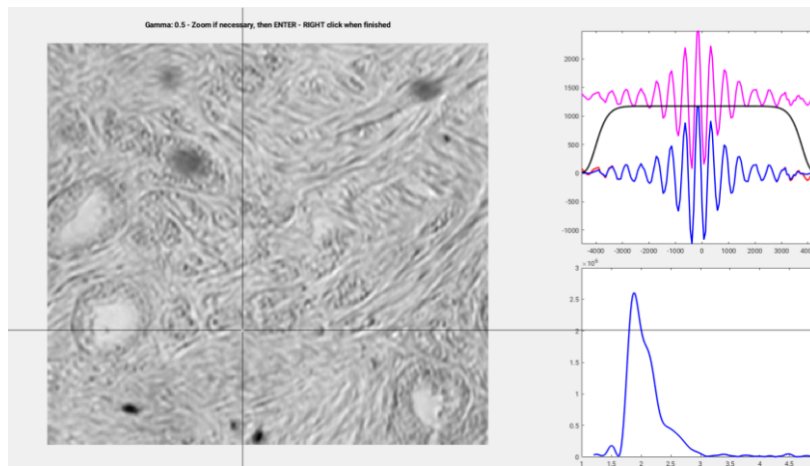


Figura 26 – Uma das etapas do tratamento de dados. O primeiro quadro à esquerda apresenta a imagem de um tecido biológico e indica a seleção de um pixel da região de interesse. No canto superior direito está o interferograma do pixel e no canto inferior direito a Transformada de Fourier do interferograma mostrando um espectro em pseudofrequência.

5.3 Iluminação do microscópio

A iluminação das amostras de um microscópio tem um papel de grande importância na microscopia ótica. Existem diversas configurações de iluminação para microscópios, cada uma delas indicada para diferentes tipos de amostra ou tipo de análise que se deseja realizar. As configurações de iluminações diferem principalmente pelo campo (claro ou escuro), pelo sentido da iluminação sobre a amostra (transmissão ou reflexão), no perfil de intensidade da iluminação (uniforme, gaussiano, etc.), nas fontes de luz utilizadas (lâmpadas, lasers, LEDs, etc.) e também nas regiões do espectro eletromagnético (infravermelho, visível e ultravioleta, por exemplo) que essas fontes emitem. Cada tipo de iluminação apresenta suas vantagens e desvantagens conforme a sua utilização.

5.3.1 A Iluminação Köhler

A iluminação Köhler [25] consiste em um princípio básico: iluminação uniforme e intensa no plano da amostra sem a formação da imagem da fonte de luz. Essa iluminação é utilizada em microscópios comerciais tanto no modo transmissão quanto no modo de reflexão geralmente utilizando lâmpadas incandescentes como fonte de luz. A iluminação Köhler utiliza três lentes convergentes em uma configuração específica detalhada na figura 27.

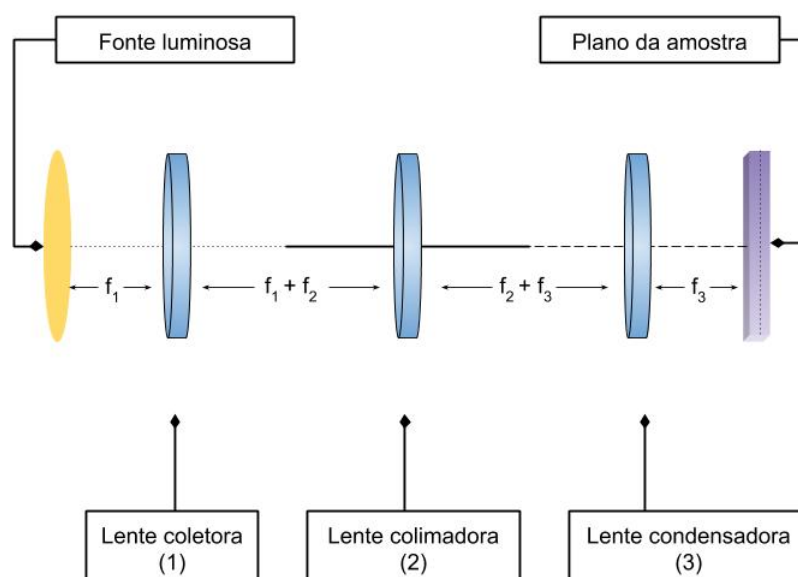


Figura 27 – Diagrama apresentando a configuração do módulo de Iluminação Köhler. Uma fonte de luz e três lentes convergentes. O diagrama indica também a posição relativa entre os elementos da montagem em termos das distâncias focais das lentes. As distâncias f_1 , f_2 e f_3 representam, respectivamente, as distâncias focais da lente coletora (1), colimadora (2) e condensadora (3).

A fonte de iluminação é uma lâmpada incandescente e a primeira lente é uma lente convergente para coletar a luz proveniente da fonte - lente coletora. A lâmpada é posicionada no plano focal da lente coletora. A segunda lente (colimadora) é posicionada de modo que o plano focal coincida com o plano focal da lente coletora. A terceira e última lente (lente condensadora) da configuração é posicionada de modo que o seu foco posterior coincida também com o foco da lente colimadora. A Figura 27 indica as posições relativas das lentes, da fonte luminosa e do plano da amostra. De acordo com a figura 28 observamos uma das características fundamentais da iluminação: Os raios provenientes de um mesmo ponto da fonte de luz emergem como raios paralelos da lente condensadora, ou seja, no plano focal da lente condensadora (plano da amostra) não há formação de imagem da fonte de iluminação. O plano focal da lente condensadora tem iluminação uniforme e é a região onde a intensidade luminosa é maior. Esses são os elementos básicos da iluminação, outros elementos como atenuadores, filtros espaciais e espectrais podem ser acrescentados no caminho óptico conforme o desenho experimental.

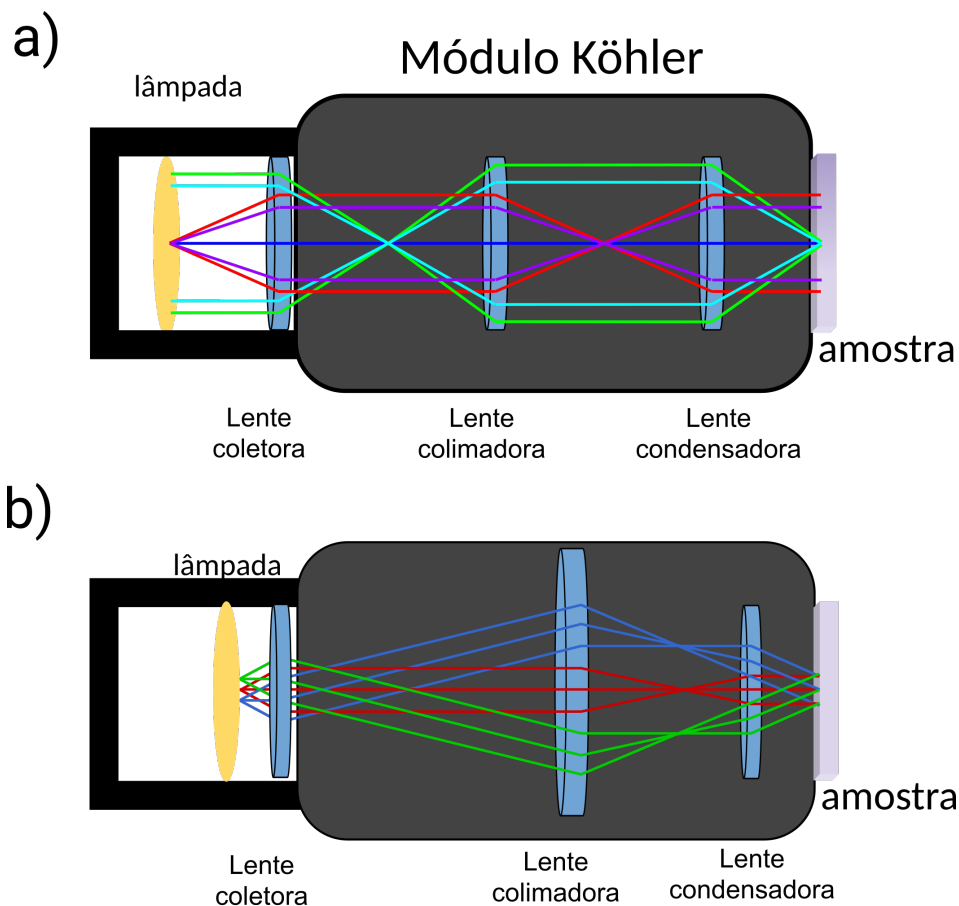


Figura 28 – Diagrama para a iluminação Köhler. Raios provenientes de um mesmo ponto da fonte de luz emergem paralelos no plano da amostra. Incidem sobre o mesmo ponto no plano da amostra apenas raios provenientes de pontos distintos da fonte de luz. Não há formação de imagem da fonte luminosa no plano da amostra.

A figura 28b) mostra o diagrama Köhler com raios luminosos provenientes de pontos diferentes da fonte luz. Esse diagrama é útil para ilustrar uma característica fundamental desse arranjo: a uniformidade da iluminação também no plano focal da lente condensadora (que também é o plano da amostra) notando que a quantidade de raios que chega em um ponto qualquer do plano focal é a mesma. Na configuração experimental adotada neste trabalho a lente condensadora da iluminação é também a objetiva do microscópio. Utilizando essa configuração de lentes, obtivemos uma iluminação adequada utilizando também lâmpadas de LED na região do visível.

5.3.2 Iluminação com laser

Nessa seção apresentamos a configuração de iluminação utilizando laser para a excitação das amostras e obtenção de imagens de fluorescência.

A iluminação utilizando o laser como fonte de luz apresenta algumas vantagens como o controle da potência e comprimento de onda da radiação incidente no plano da amostra e uma conveniência para a utilização de filtros espectrais para coleta do sinal de fluorescência da amostra barrando a radiação proveniente do espalhamento do sinal de excitação. Utilizando um laser com perfil gaussiano para a intensidade luminosa obtemos um perfil não uniforme de intensidade sobre a amostra. Se o laser incide diretamente sobre a objetiva a área iluminada da amostra é pequena quando comparada à área imageada pelo microscópio. A estratégia utilizada para se obter uma iluminação adequada no plano da amostra utilizando o laser como fonte de luz é expandir o feixe de laser para obter uma área iluminada maior da amostra, compatível com o tamanho da área observada, após a passagem do feixe pelas lentes do conjunto de lentes da iluminação. Para iluminar uma área maior da amostra, utilizamos um conjunto de lentes para expandir o feixe da iluminação antes da objetiva. Desse modo a área iluminada da amostra é comparável ao campo observado. Ao final do processo o perfil de intensidade não é constante no plano da amostra. A figura 29 apresenta configuração de lentes utilizadas para expandir o feixe de iluminação do laser em reflexão.

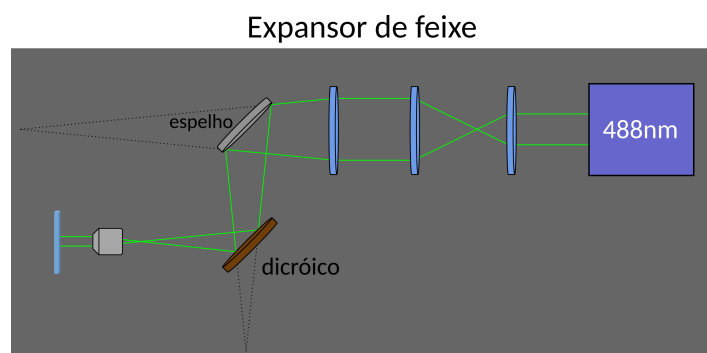


Figura 29 – Conjunto de lentes utilizado para expandir o feixe de laser no plano da amostra em reflexão. A objetiva é uma das lentes do módulo de iluminação.

Neste trabalho utilizamos um módulo expensor (telescópio) para expandir o feixe de laser e iluminar uma região maior da amostra, compatível com o campo observado pelo microscópio conforme mostra a figura 29. Utilizamos como fonte de luz um laser centrado em $\lambda = 488$ nm. Esse comprimento de onda de excitação é compatível com a janela de excitação das amostras de materiais biológicos estudadas, especialmente as fibras de colágeno.

De acordo com [26] para atingir uma iluminação uniforme no plano da amostra utilizando um laser como fonte de luz é necessária a utilização de um instrumento óptico que altera o perfil de intensidade do modo do laser e o como resultado a iluminação com perfil gaussiana é transformada em uma iluminação com perfil aproximadamente constante como indica a figura 30, sem perdas significativas na intensidade luminosa.

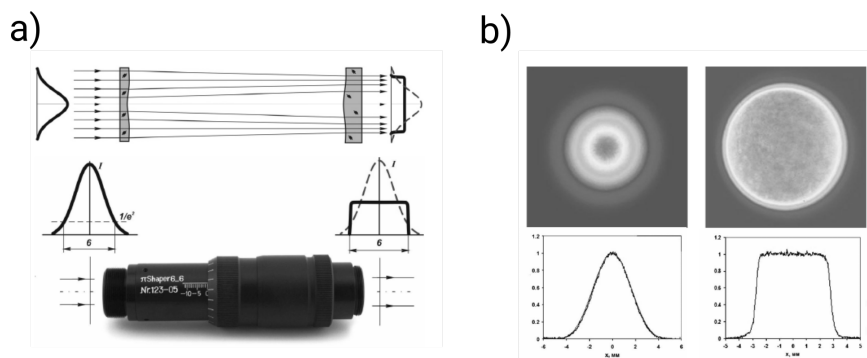


Figura 30 – a) Princípio de funcionamento do π Shaper, instrumento óptico utilizado para mudar o perfil de intensidade gaussiano do laser para um perfil constante sem perdas significativas na intensidade luminosa. b) Perfil de intensidade obtido experimentalmente em duas condições distintas de iluminação. Figura adaptada de [26].

5.4 Calibração espacial

Tanto a escala quanto a resolução do microscópio foram obtidas através do imageamento de alvos de teste de resolução (régua com marcações micrométricas) próprios para microscopia. A figura 31 apresenta um alvo de teste de resolução semelhante ao utilizado para obter a escala e a resolução das imagens. Durante a calibração o alvo é posicionado em frente à objetiva do microscópio (no plano da amostra) e uma imagem da régua é capturada. Utilizando as informações fornecidas pelo fabricante para o distanciamento entre os pares de linhas, uma calibração espacial é gerada utilizando um *software* para tratamento de imagens. A calibração utilizando a régua é utilizada como escala para as amostras imageadas com a mesma configuração de lentes para o aumento. Utilizando o *software* de calibração obtemos a relação de escala de $r_{esc} = 0,64$ pixels/ μ m utilizando a lente de aumento de $20\times$ como indica a figura 32. A distância de 100μ m entre as marcações

da régua equivale a 64 pixels do sensor de imageamento. Cada pixel do sensor tem a forma quadrangular de lado $l_{pixel} = 6,45 \mu\text{m}$. O tamanho da imagem é obtido usando a relação $l_i = N_{pixels} l_{pixel}$ e o tamanho do objeto conhecido em termos da relação de escala é dado por $l_o = N_{pixels} r_{esc}^{-1}$. O Aumento efetivo é dado pela equação:

$$M_{ef} = \frac{l_i}{l_o} = l_{pixel} r_{esc} \quad (5.2)$$

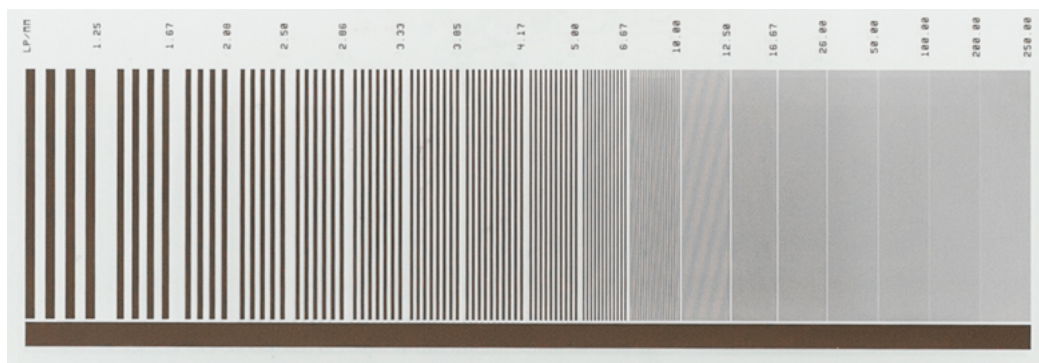


Figura 31 – Alvo de teste de resolução semelhante ao utilizado para obter a escala das imagens do microscópio hiperespectral

Utilizando a objetiva de $20\times$ o aumento efetivo obtido é de $4\times$ nesta configuração de calibração. Ainda de acordo com a figura[32] vemos que é possível resolver os pares de linhas menores entre as barras de medida. Entre o espaçamento de $100 \mu\text{m}$ das linhas mais grossas há 10 linhas mais finas com espaçamento de $10 \mu\text{m}$ que são identificadas como objetos distintos no processo de formação da imagem.

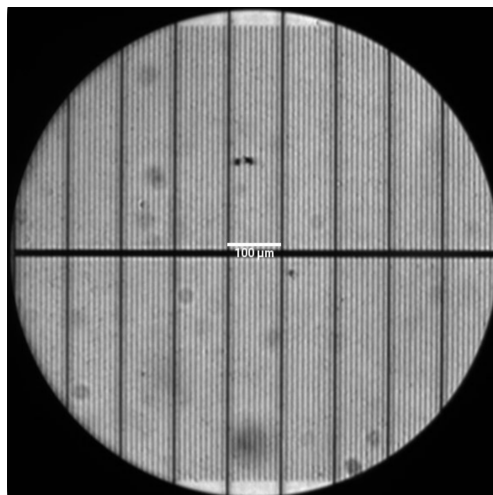


Figura 32 – Imagem do alvo de teste de resolução para obtenção da barra de escalas para as imagens obtidas com o microscópio hiperespectral.

A figura 33 apresenta uma calibração e uma imagem obtida com a objetiva de aumento de $100\times$. Vemos em detalhe a mesma região do alvo de teste de calibração com um aumento e resolução ainda maior. A relação de escala obtida para a lente de $100\times$ é $r_{esc} = 5,01 \text{ pixels}/\mu\text{m}$ e o aumento efetivo é de cerca de $30\times$. Utilizando a escala identificamos que o diâmetro das esferas na imagem é de $2 \mu\text{m}$ e a resolução é suficiente para separar a imagem de esferas aproximadamente tangentes cuja a distância de separação entre os centros $d = 2,2 \mu\text{m}$.

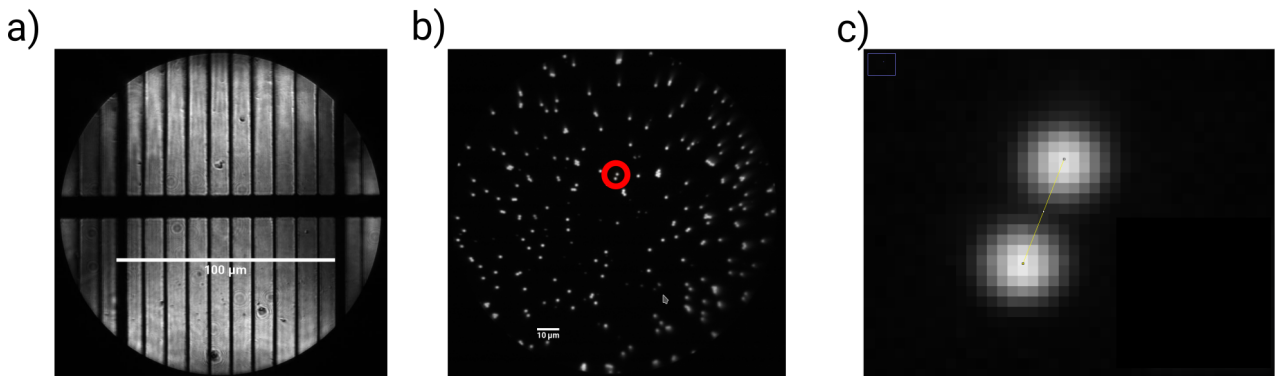


Figura 33 – a) Alvo de teste de resolução utilizado para gerar as escalas para o imageamento utilizando a objetiva de $100\times$. b) Imagem do MH das esferas com diâmetro de cerca de $2,0 \mu\text{m}$. c) Resolução para objetiva de $100\times$ mostrando esferas separadas por uma distância $d_{centros} = 2,2 \mu\text{m}$.

5.5 Calibração espectral

Nessa seção apresentamos um método para a calibração do MH. Na seção 5.2 apresentamos o interferômetro de cristais birrefringentes utilizado para produzir os interferogramas de cada pixel da imagem. O interferograma obtido é tal que o eixo x apresenta a unidade arbitrária de passos do motor. Um espectro obtido através do interferograma é chamado de espectro em pseudofrequência, e pode ser entendido como o espectro a menos de uma função de calibração que faz a correspondência entre o espectro em pseudofrequência e o espectro em frequência.

Para determinar a função calibração fazemos o imageamento hiperespectral de uma amostra cujo espectro é conhecido. O processo apresentado aqui envolve o imageamento de uma lâmpada de Hg com os picos na região do visível. Após a obtenção do pseudoespectro identificamos os picos do espectro obtido através do MH com os valores obtidos utilizando o espectro conhecido da lâmpada de Hg obtido utilizando um espectrômetro comercial baseado em elementos de dispersão. Uma calibração é gerada conforme indica a figura 34 que apresenta uma calibração obtida utilizando este procedimento. A função de calibração é gerada selecionando pelo menos três picos conhecidos na região de interesse do espectro observado.

A figura 35 apresenta uma comparação entre o espectro de emissão da lâmpada de Hg obtido através do MH e espectrômetro comercial. A comparação entre os espectros obtidos através dos dois métodos distintos mostra que a resolução espectral do MH é em torno de 7 nm a 9 nm na região do visível. Uma diferença entre os espectros obtidos que chama a atenção é o pico em $\lambda=508$ nm com uma intensidade elevada (a maior na região do visível) observada pelo espectrômetro. Esse pico é relacionado à segunda ordem de difração da emissão da lâmpada de Hg no comprimento de onda $\lambda=254$ nm [27]. A elevada intensidade deste pico está relacionada também com a otimização dos elementos de dispersão do espectrômetro para a região visível do espectro eletromagnético. Como se trata de um fenômeno relacionado à difração, este pico não é observado em uma medida realizada através do MH uma vez que o espectro é obtido através de um espectrômetro baseado em birrefringência. A calibração obtida através deste procedimento é utilizada como referência para o imageamento hiperespectral feito na mesma configuração do microscópio, de maneira similar à calibração da escala e resolução.

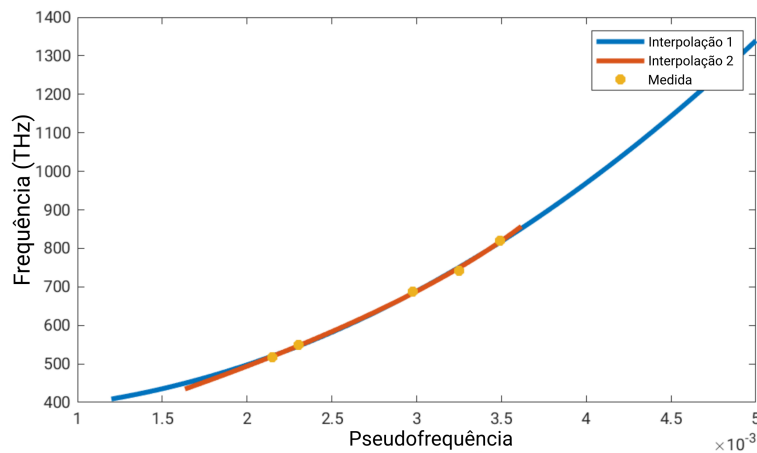


Figura 34 – Função de calibração obtida através do imageamento hiperespectral de uma lâmpada de Hg cujo espectro é conhecido. A função apresenta a correspondência entre o espectro em pseudofrequência e a frequência na unidade de THz.

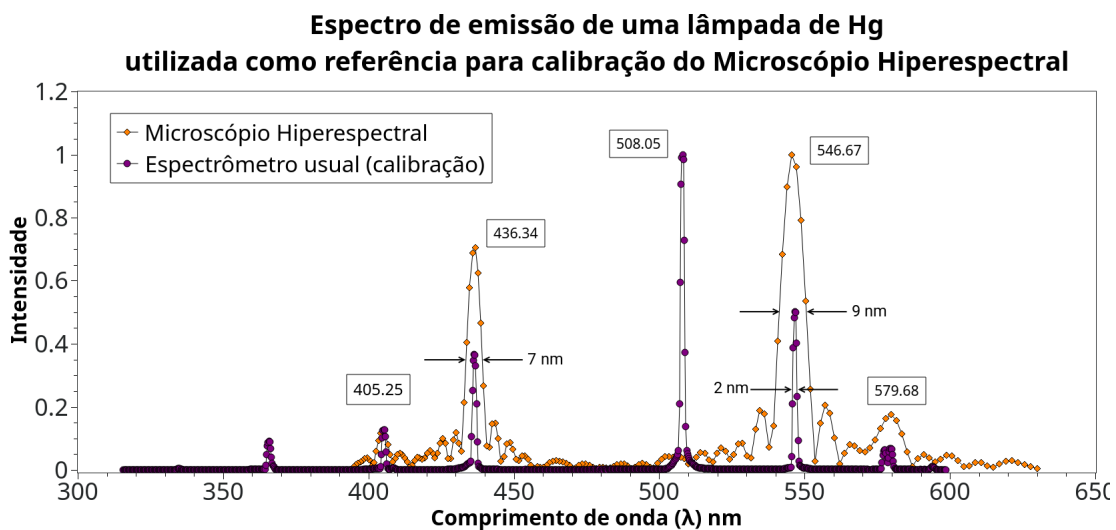


Figura 35 – Comparação entre os espectro de emissão da lâmpada de Hg obtida utilizando dois métodos distintos. Em laranja o espectro obtido utilizando o microscópio hiperespectral e em violeta o espectro obtido utilizando um espectrômetro comercial baseado em elementos dispersivos.

6 Amostras

Nessa seção descrevemos detalhes das amostras analisadas no MH. Apresentamos uma amostra para calibração, uma amostra para teste e as amostras utilizadas para a aplicação da técnica. As amostras, respectivamente, são: emissores da tela de um telefone celular, fibras de papel coradas com rodamina e cortes histológicos de biópsias de tecido de próstata com coloração e sem coloração.

Os emissores da tela de celular são de um aparelho do fabricante Samsung, modelo J5. De acordo com especificações do fabricante [28] o dispositivo tem a capacidade de reproduzir 16 M cores distintas. Esse valor é da ordem de grandeza da quantidade de cores estimada na seção 4.4 para o padrão RGB com 256 intensidades diferentes para cada uma das cores primárias. No capítulo 7 apresentamos as imagens monocromáticas obtidas com as objetivas de 40 \times e 60 \times de aumento onde se observa os emissores individualmente.

Uma amostra para teste de papel corado com rodamina foi obtida acrescentando gotas de uma solução do corante rodamina sobre um pedaço de folha de papel. Posteriormente a amostra de papel corado foi fixada entre duas lâminas de vidro utilizadas para microscopia. No capítulo 7 apresentamos as imagens monocromáticas obtidas com as objetivas de 40 \times e 100 \times de aumento das fibras de papel.

As amostras de tecido de próstata [12, 29] são provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte. As amostras são de biópsias de pacientes participantes de tratamento de câncer de próstata no período entre Abril e Agosto de 2015. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG e pelo Conselho Nacional de Saúde brasileiro de acordo com a resolução 196/96 sobre a pesquisa com seres humanos como sujeitos). Os participantes da pesquisa consentiram com os métodos utilizados para os experimentos. As amostras utilizadas consistem de parte de um conjunto de amostras provenientes de 8 pacientes diagnosticados com câncer de próstata que passaram pelo procedimento de prostatectomia radical. Os tecidos histológicos são provenientes de punções de 1 mm de diâmetro e de biópsias guiadas por agulha, ambas realizadas em diferentes regiões da glândula de próstata. A preparação das amostras é feita de acordo com um procedimento padrão em histologia para análises patológicas, envolvendo etapas de desidratação, clarificação e parafinização. Os cortes histológicos foram feitos com um micrótomo e têm espessuras entre 4 μm a 6 μm . Esses cortes foram fixados em lâminas de microscopia e alguns cortes passaram pelo procedimento de marcação com a coloração Hematoxilina e Eosina. Essas amostras fazem parte do material de estudo de outros trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Biofotônica e colaboradores [29], incluindo a tese de doutoramento de Aloísio M. Garcia [12].

Na morfologia do corte histológico de tecido de próstata destacam-se a predominância de dois tipos de estrutura: a região de glândulas prostáticas e a região do tecido conjuntivo, também chamado de estroma. As glândulas prostáticas são denominadas de ácinos devido a sua semelhança com um colar de contas ou bagas (*acini* em latim) (uma denominação genérica para frutos como a uva). O interior das glândulas é referenciado na literatura como região de lúmen e se apresenta como espaço vazio nos cortes histológicos onde se observa diretamente a fonte de iluminação em uma imagem de microscopia por transmissão. O tecido conjuntivo entre as glândulas é denominado de estroma e apresenta grande quantidade de fibras de colágeno. A figura 36 apresenta uma imagem de microscopia óptica de um corte histológico corado de biópsia de tecido de próstata indicando as regiões de glândulas e o estroma [12].

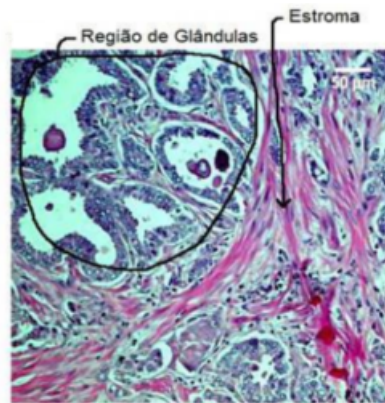


Figura 36 – Imagem de microscopia óptica de um corte histológico corado de biópsia de tecido de próstata indicando as regiões de glândulas e estroma presentes na morfologia do tecido. Figura adaptada de [12].

7 Resultados

Neste capítulo apresentamos os resultados de imageamento hiperespectral. As amostras selecionadas são os emissores RGB da tela de um telefone celular, amostra de fibras de papel coradas com rodamina, autofluorescência em tecido biológico (cortes histológicos de biópsia de próstata) e fluorescência de tecidos biológicos marcados com corantes fluorescentes.

7.1 Emissores RGB da tela de um telefone celular.

A figura 37 apresenta imagens monocromáticas dos emissores da tela do telefone celular obtidas utilizando duas objetivas diferentes. A figura 37a) apresenta uma imagem obtida utilizando uma objetiva de aumento de $40\times$ e é possível observar a periodicidade dos emissores do celular. A região retangular demarca a menor estrutura que se repete periodicamente e é identificada como um *pixel* da tela do celular. A figura 37b) foi obtida utilizando uma objetiva de $60\times$ de aumento. As barras de escala representam a mesma medida de $50\ \mu\text{m}$ em ambas imagens. O *pixel* da tela do celular tem cerca de $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ e os emissores individuais têm formato retangular com largura de cerca de $31\ \mu\text{m}$ e comprimentos diferentes para cada uma das cores diferentes de cerca de $31\ \mu\text{m}$, $63\ \mu\text{m}$ e $96\ \mu\text{m}$.

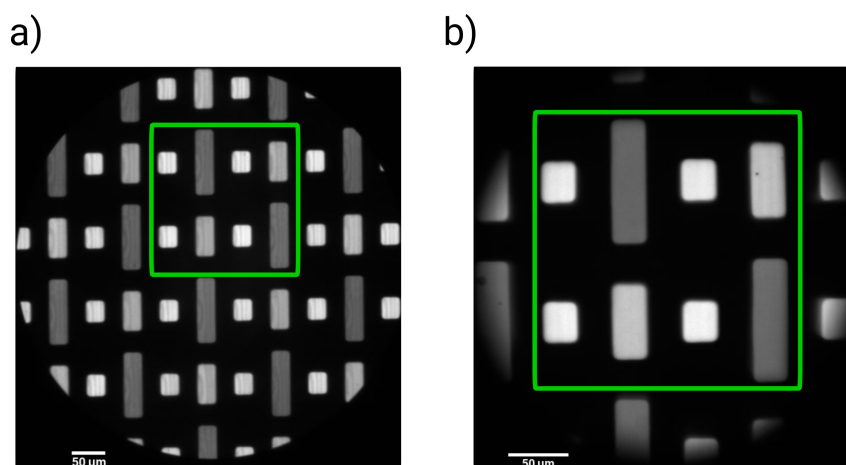


Figura 37 – (a) Emissores do telefone celular. Os emissores da tela tem formato retangular com largura $l \approx 30\ \mu\text{m}$ e comprimentos distintos para cada uma das cores R, G e B. Imageamento realizado com a objetiva de $40\times$ de aumento. O retângulo em verde indica a menor região que se repete, formando um *pixel* da tela do celular. (b) Emissores do celular imageados com a objetiva de $60\times$ de aumento.

A figura 38a) mostra um mapa em falso-RGB obtido a partir do imageamento hiperespectral dos emissores do telefone celular. Essa figura apresenta uma região da imagem obtida utilizando a objetiva de 40 \times . Na figura 38b) vemos os espectros diferentes para cada um dos emissores, identificando apenas uma assinatura espectral por emissor. Essa amostra representa bem a capacidade do Microscópio Hiperespectral para a identificação de assinaturas espectrais distintas em uma mesma imagem com resolução espacial da ordem de μm . Na figura 38c) apresentamos a comparação com as funções R, G e B para a geração do mapa em falso-RGB a partir do espectro de cada pixel da imagem. Conforme discutido na seção 5.5, uma amostra cujo espectro apresenta pelo menos três picos de intensidade conhecidos na região de interesse pode ser utilizada para geração de uma função de calibração espectral. Assim utilizamos essa imagem também para a calibração espectral do MH. A figura 38d) apresenta o resultado da comparação dos espectros obtidos utilizando duas técnicas distintas: espectrômetro baseado em elementos de dispersão e o Microscópio Hiperespectral. Os picos identificados pelo espectrômetro foram utilizados como referência para a calibração do MH. As telas de LED de um telefone celular gera uma diversidade de cores utilizando apenas três emissores (RGB) com intensidades relativas diferentes, baseado no padrão de cores por adição RGB.

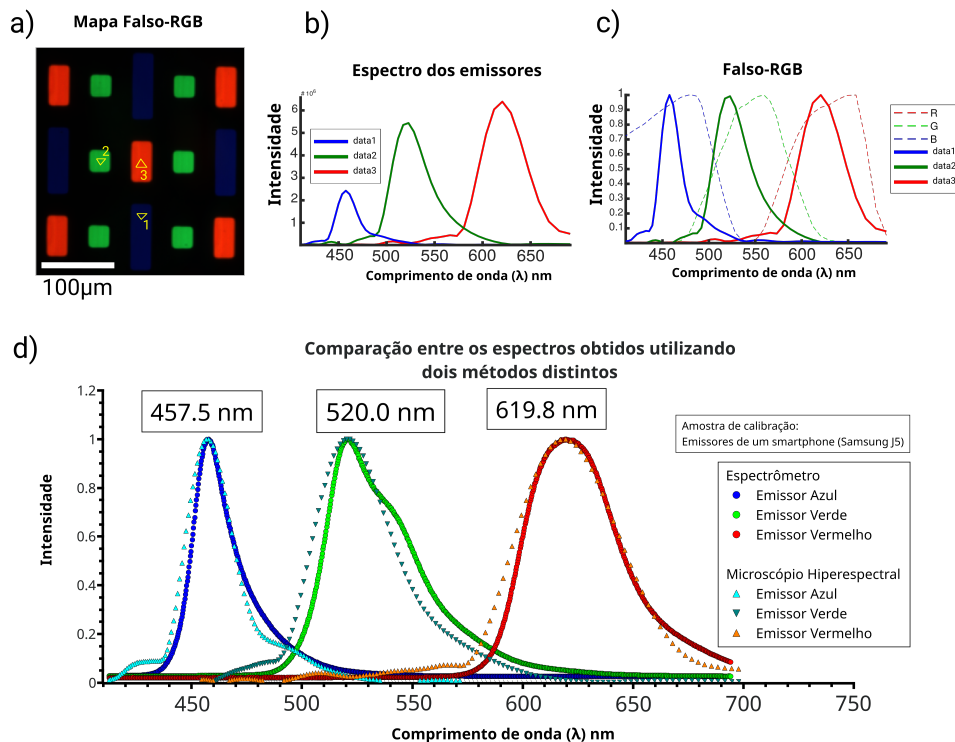


Figura 38 – a) Mapa falso-RGB dos emissores tela de LED de um telefone celular. Três emissores de tamanhos e cores distintos. b) Espectro de emissão de cada emissor. c) Espectro normalizado e comparado com as funções utilizadas para gerar um mapa de falso-RGB. d) Comparação entre o espectros obtidos por dois métodos distintos: espectrômetro baseado em materiais dispersivos e o MH.

7.2 Fibras de papel coradas com rodamina

A figura39 apresenta imagens monocromáticas das fibras de papel coradas com rodamina excitadas com o *laser* centrado em 488 nm. A figura39a) apresenta uma imagem das fibras de papel obtida com a objetiva de 40× de aumento e a barra de escala mede 50 μm . O diâmetro das fibras de papel é da ordem de 10 μm . A figura39b) apresenta uma imagem monocromática das fibras de papel obtidas utilizando a objetiva de 100× de aumento mostrando fibras com diâmetros variados. A barra de escala é de 20 μm .

A figura40a) apresenta o Mapa falso-RGB obtido a partir do imageamento hiperespectral das fibras de papel coradas com rodamina e excitadas por um *laser* centrado em 488 nm. A imagem foi obtida utilizando a objetiva de 40×. A potência sobre a amostra é $P=17,5$ mW e a integração do sinal da imagem é $t=1000$ ms. No caminho do braço de imageamento foram posicionados um espelho dicróico (DM505, do fabricante OLYMPUS) para a reflexão do sinal de excitação no plano da amostra e um filtro Edge 488 nm (Semrock LP02-488RE-25) em frente a câmera para filtrar a radiação espalhada do *laser*.

Utilizando a calibração proveniente dos emissores do telefone celular, obtivemos uma boa concordância entre o espectro de fluorescência da rodamina presente na amostra obtido através do Microscópio Hiperespectral e do espectrômetro baseado em materiais dispersivos, conforme indica a figura40d), que indica a comparação entre o espectro obtido pixel-a-pixel da imagem através do MH com o espectro sem resolução espacial obtido utilizando um espectrômetro. Através do MH identifica-se o pico da fluorescência da rodamina em $\lambda_{pico_{MH}}=585,6$ nm através da medida em um espectrômetro identifica-se um pico em $\lambda_{pico}=590,3$ nm. Quando comparamos os espectros de fluorescência obtidos, como apresenta a figura 40d), vemos que os gráficos parecem transladados um em relação ao outro. Isso pode estar relacionado com a imprecisão em determinar os picos dos espectros de referência utilizados para a calibração do Microscópio Hiperespectral, resultando em diferenças entre os espectros da ordem da resolução espectral o MH.

A calibração utilizada para as demais amostras é idêntica ao procedimento descrito na seção5.5, utilizando uma lâmpada de Hg.

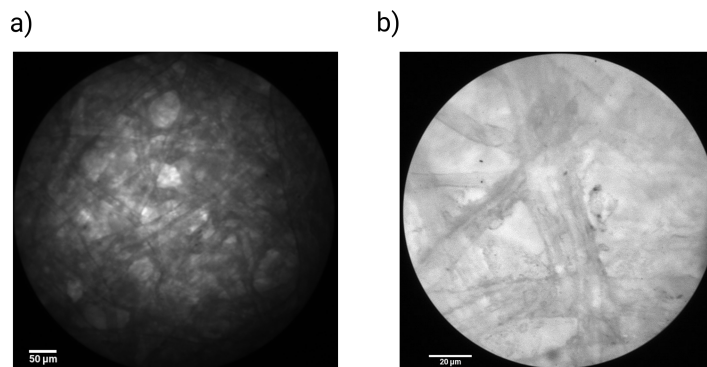


Figura 39 – Fibras de papel coradas com rodamina. A figura (a) apresenta a imagem de fluorescência obtida utilizando uma objetiva de 40× de aumento. O diâmetro das fibras de papel é da ordem de 10 μm . A figura (b) apresenta uma imagem das fibras de papel com diferentes diâmetros obtida utilizando a objetiva de 100× de aumento.

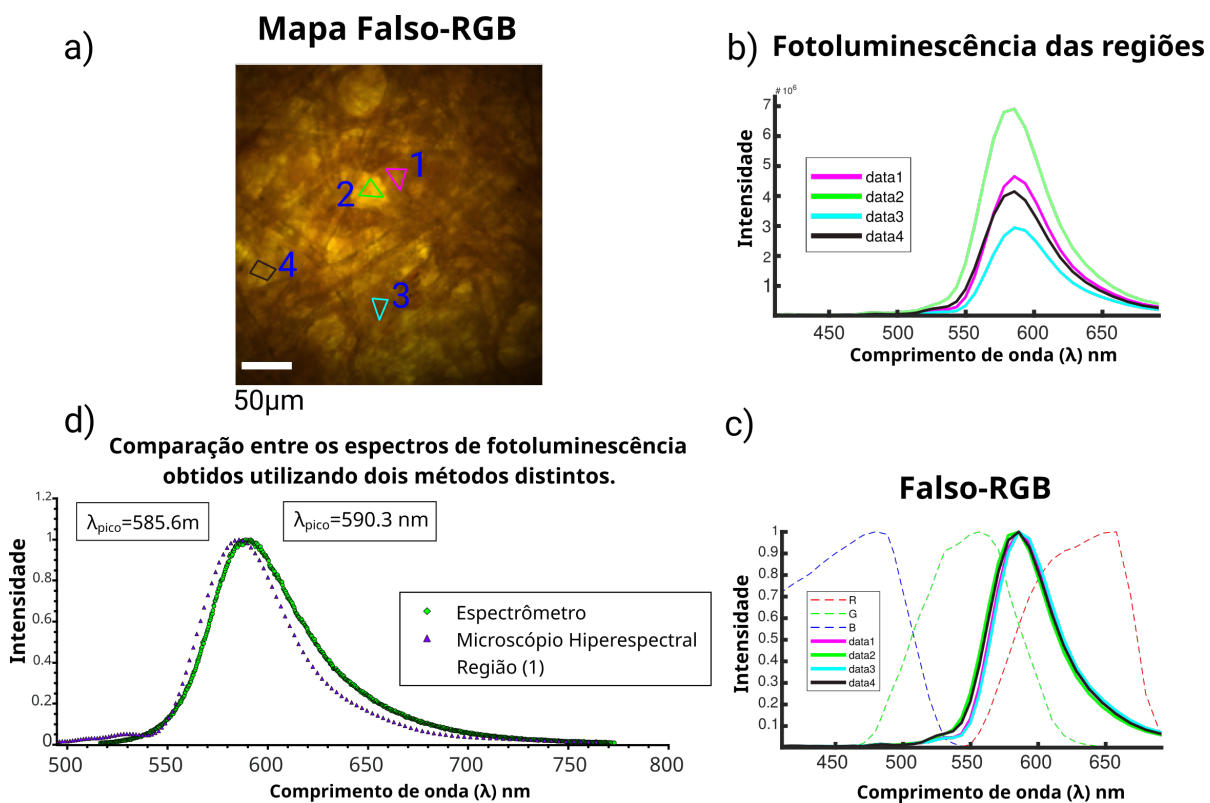


Figura 40 – a) Mapa falso-RGB de fibras de papel coradas com rodamina excitada em reflexão por um laser 488 nm. b) Espectro de emissão das regiões indicadas na imagem. c) Espectro normalizado e comparado com as funções utilizadas para gerar um mapa de falso-RGB. d) Comparação entre os espectros obtidos por dois métodos distintos: espectrômetro baseado em materiais dispersivos e o MH.

7.3 Tecido de próstata

7.3.1 Autofluorescência do colágeno

A figura 41 apresenta um corte histológico de tecido de próstata não corado excitado com o laser centrado em 488 nm. No campo de visão observa-se a predominância do tecido conjuntivo entre as glândulas e uma glândula cuja parede tem uma célula de espessura. A barra de escala tem 100 μm .

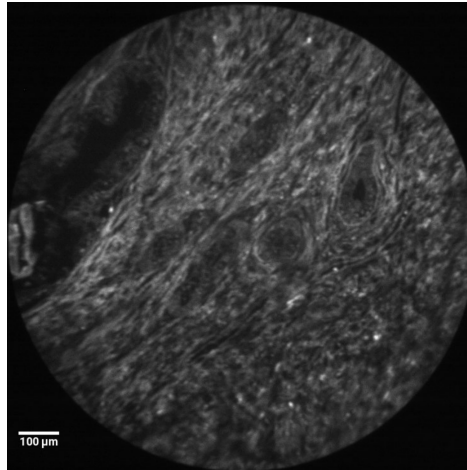


Figura 41 – Imagem de autofluorescência de um corte histológico de tecido de próstata sem corante. Excitação em reflexão com um laser centrado em 488 nm. Imagem obtida utilizando a objetiva de 20 \times de aumento.

A figura 42a) apresenta um mapa em falso-RGB obtido a partir da imagem hiperespectral da autofluorescência do tecido de próstata excitado por reflexão com o laser 488 nm. A região imageada apresenta fibras de colágeno e ácinos. A potência sobre a amostra é $P=8,0$ mW e integração do sinal da imagem é $t=5000$ ms. Um espelho dicróico DM505 para refletir a excitação para o plano da amostra e um filtro Edge 488 nm encontram-se no braço de imageamento do MH. Utilizando o MH identifica-se o pico da autofluorescência das fibras de colágeno em $\lambda_{pico_{MH}}=545,5$ nm e utilizando um espectrômetro identifica-se o pico da autofluorescência em $\lambda_{pico}=553,4$ nm. Esse resultado é consistente com a autofluorescência do tecido conjuntivo que é essencialmente a fluorescência do colágeno (fluoróforo presente em maior quantidade no tecido conjuntivo) [18] apresentando um pico em torno de $\lambda_{pico} \approx 540$ nm para excitação com o laser centrado em 473 nm, apresentada na seção 4.1.

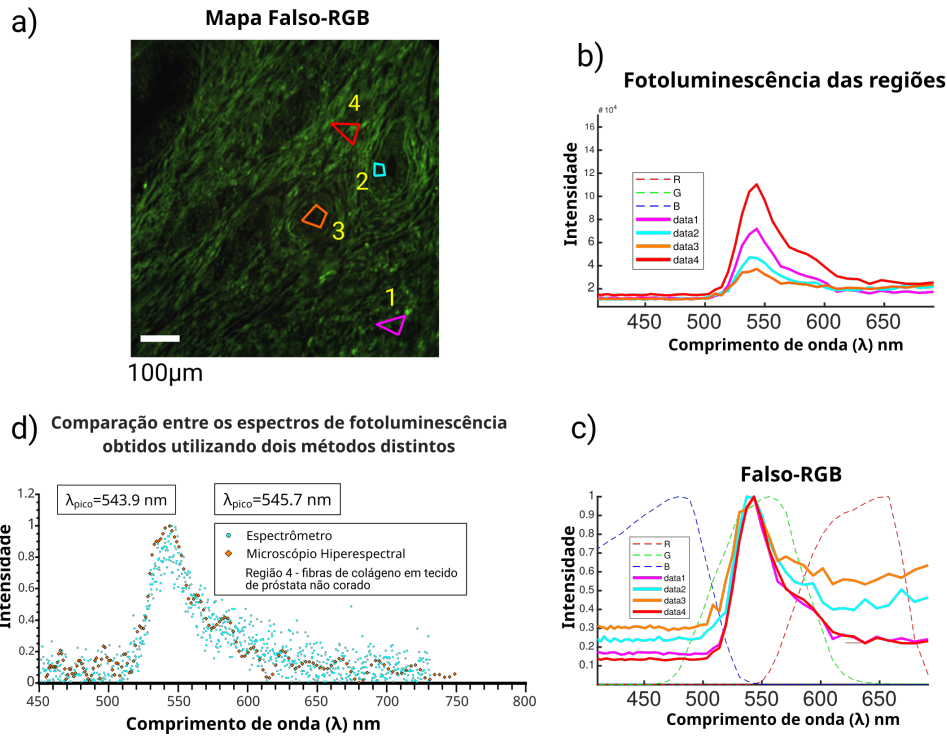


Figura 42 – a) Mapa falso-RGB de tecido de próstata não-corado excitado em reflexão por um laser centrado em 488 nm. b) Espectro de emissão das regiões indicadas na imagem. c) Espectro normalizado e comparado com as funções utilizadas para gerar um mapa de falso-RGB. d) Comparação entre os espectros obtidos por dois métodos distintos: espectrômetro baseado em materiais dispersivos e o MH.

7.3.2 Fluorescência do corante eosina ligado às fibras de colágeno

A figura 43 mostra uma imagem monocromática de um corte histológico de biópsia de tecido de próstata corado com Hematoxilina e Eosina, H&E, excitada pelo laser 488 nm em reflexão. A barra de escala é de 100 μm . A região imageada apresenta glândulas de 100 μm a 300 μm de diâmetro e fibras de colágeno do tecido conjuntivo. O interior das glândulas (vasos, etc) do tecido de próstata (e outros tecidos) é referenciado na literatura como *lúmen*.

A figura 44 apresenta uma imagem hiperespectral de tecido de próstata corado com H&E excitado em reflexão com o laser 488 nm. A figura 44a) apresenta um mapa em falso-RGB da fluorescência do corante eosina ligado às fibras de colágeno. A eosina é um corante utilizado para a marcação do citoplasma e tecido extracelular e domina a fluorescência observada. A potência sobre a amostra é $P=8$, mW e integração do sinal da imagem é $t=2700$ ms. Nessa medida não se observa a fluorescência do corante hematoxilina utilizado para marcar o núcleo das células dos ácinos. Conforme discutido na seção 5.4 a resolução do imageamento utilizando a objetiva de $20\times$ é em torno de 10 μm o que dificulta a separação espacial do núcleo da célula e da região extranuclear. Utilizando o MH identifica-se o pico da fluorescência da eosina na região das fibras de

colágeno em $\lambda_{pico_{MH}}=549,9$ nm e utilizando um espectrômetro identifica-se o pico da autofluorescência em $\lambda_{pico_{MH}}=553,4$ nm. Apresentamos na figura também o espectro de fluorescência da solução de eosina em etanol [30] (linha preenchida) com o pico em $\lambda_{ref}=543,5$ nm. Comparando com a imagem da amostra não corada (figura42), aqui as regiões de células são menos visíveis, uma vez que a eosina cora mais as fibras da matriz extracelular. Essas imagens poderão ser utilizadas para estudos de organização do colágeno nestas amostras.

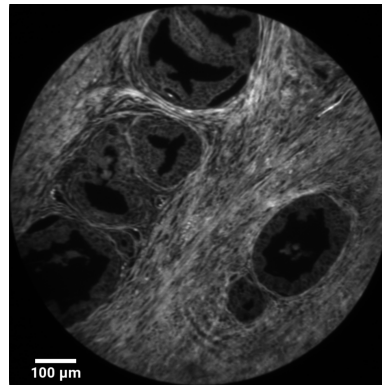


Figura 43 – Imagem de fluorescência de um corte histológico de tecido de próstata corado com H&E. Excitação em reflexão com um laser centrado em 488 nm. Imagem obtida utilizando a objetiva de 20× de aumento.

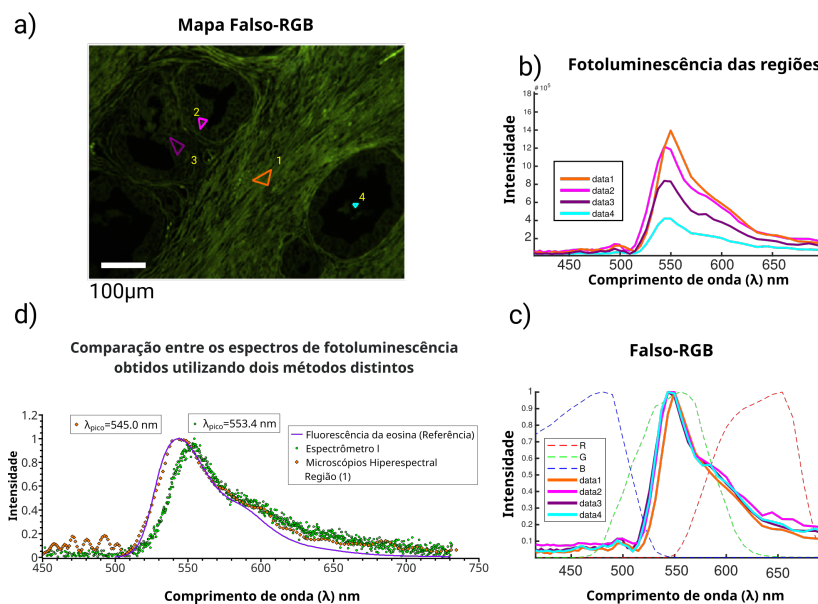


Figura 44 – a) Mapa falso-RGB de tecido de próstata corado com H&E excitado em reflexão por um laser centrado em 488nm. b) Espectro de emissão das regiões indicadas na imagem. c) Espectro normalizado e comparado com as funções utilizadas para gerar um mapa de falso-RGB. d) Comparação entre o espectros obtidos por dois métodos distintos: espectrômetro comercial e o MH e referência da fluorescência da solução de eosina em álcool obtida em [30].

7.3.3 Transmissão em tecido corado

A figura 45 mostra imagens monocromáticas de corte histológico de tecido de próstata corado com H&E de uma mesma amostra, realizadas em regiões diferentes e utilizando aumentos de $20\times$ e $60\times$. A figura 45a) apresenta uma imagem de microscopia de transmissão utilizando a objetiva de $20\times$ de aumento onde se pode observar as regiões de *lúmen* no interior das glândulas de diâmetro da ordem de $100\ \mu\text{m}$ e o tecido conjuntivo formado predominantemente por fibras de colágeno. Em uma imagem de microscopia de transmissão a região de lúmen transmite a luz de excitação sem interação com a amostra. A barra de escala é de $100\ \mu\text{m}$. A figura 45b) apresenta uma região diferente do mesmo tecido utilizando uma objetiva de $60\times$ de aumento. Além das fibras de colágeno do tecido vemos também células com diâmetro da ordem de $10\ \mu\text{m}$ de diâmetro. A barra de escala é de $50\ \mu\text{m}$.

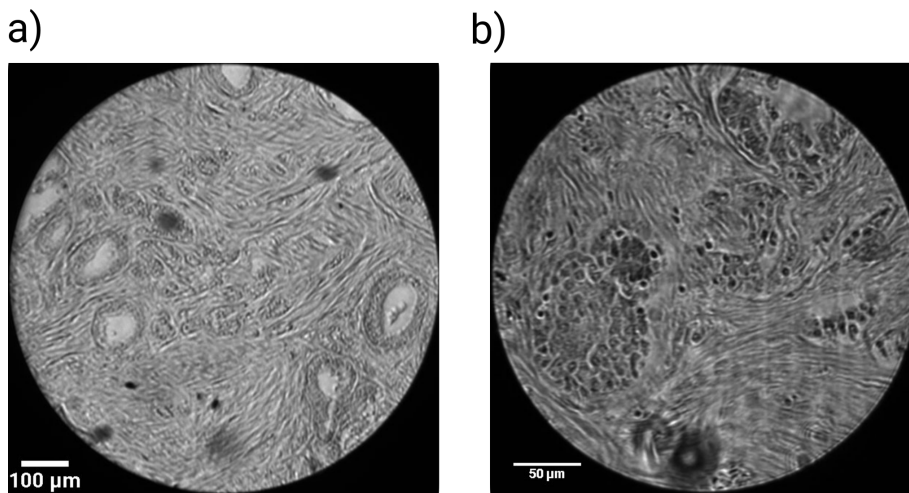


Figura 45 – A figura (a) apresenta uma imagem de transmissão em um corte histológico de tecido de próstata corado com H&E. Excitação utilizando um lâmpada. Imagem obtida utilizando a objetiva de $20\times$ de aumento. A figura (b) apresenta uma imagem de uma região diferente da mesma amostra utilizando uma objetiva de $60\times$ de aumento.

A figura 46 apresenta o imageamento hiperespectral realizado em um tecido de próstata corado com H&E utilizando uma lâmpada como fonte de iluminação. O sinal coletado é proveniente da transmissão da luz através do tecido. A imagem foi obtida utilizando uma objetiva de $20\times$ de aumento e apresenta uma região da amostra que contém fibras de colágeno e ácinos. A figura 46a) mostra o mapa de falso-RGB do tecido de próstata corado. A figura 46b) Não há filtros no braço de imageamento.

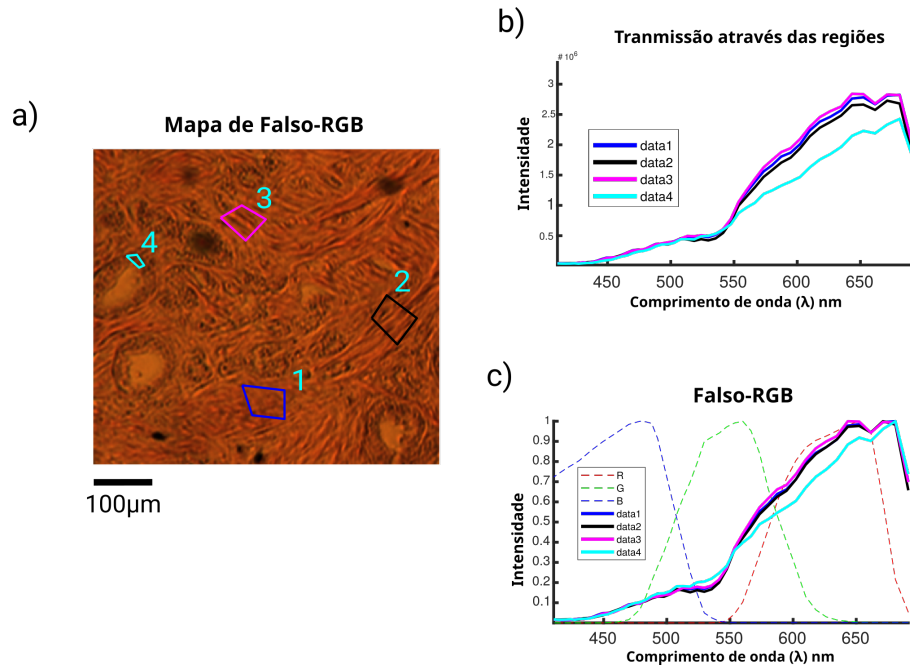


Figura 46 – a) Mapa falso-RGB de tecido de próstata corado com H&E. Transmissão da iluminação de uma lâmpada. b) Espectro de transmissão das regiões indicadas na imagem. c) Espectro normalizado e comparado com as funções utilizadas para gerar um mapa de falso-RGB.

Apresentamos a absorvância do tecido de próstata obtida através da expressão 4.3.4 para a absorvância de uma amostra. Para os cálculos, utilizamos a intensidade I_0 do sinal como a intensidade transmitida através da região de lúmen da amostra onde não há absorção pelo material e utilizando como I_T o sinal transmitido através da região 1 (fibras de colágeno) da amostra. A figura 47a) apresenta um conjunto de espectros de transmissão de pixels vizinhos em duas regiões diferentes da amostra: a região 1 com a presença de fibras de colágeno coradas com eosina e uma região de lúmen da amostra onde a luz da lâmpada não interage com a amostra e se observa o perfil de intensidade I_0 da excitação. A figura 47b) apresenta dois espectros selecionados para o cálculo da absorvância do tecido de próstata. A figura 47c) apresenta a comparação entre a absorvância da região 1 do tecido de próstata corado obtido através do MH e a referência para a absorvância da solução de eosina em etanol [30]. O pico da absorvância é $\lambda_{MH}=531,6$ nm e o pico da absorvância da eosina disponível como referência é $\lambda_{ref}=524,8$ nm. Essa diferença entre os picos de absorvância pode ser devido à mudanças no espectro de absorção do corante ligado às fibras de colágeno e em solução. Esse mesmo motivo pode estar relacionado com a diferença do perfil de absorvância nas regiões mais afastadas do máximo.

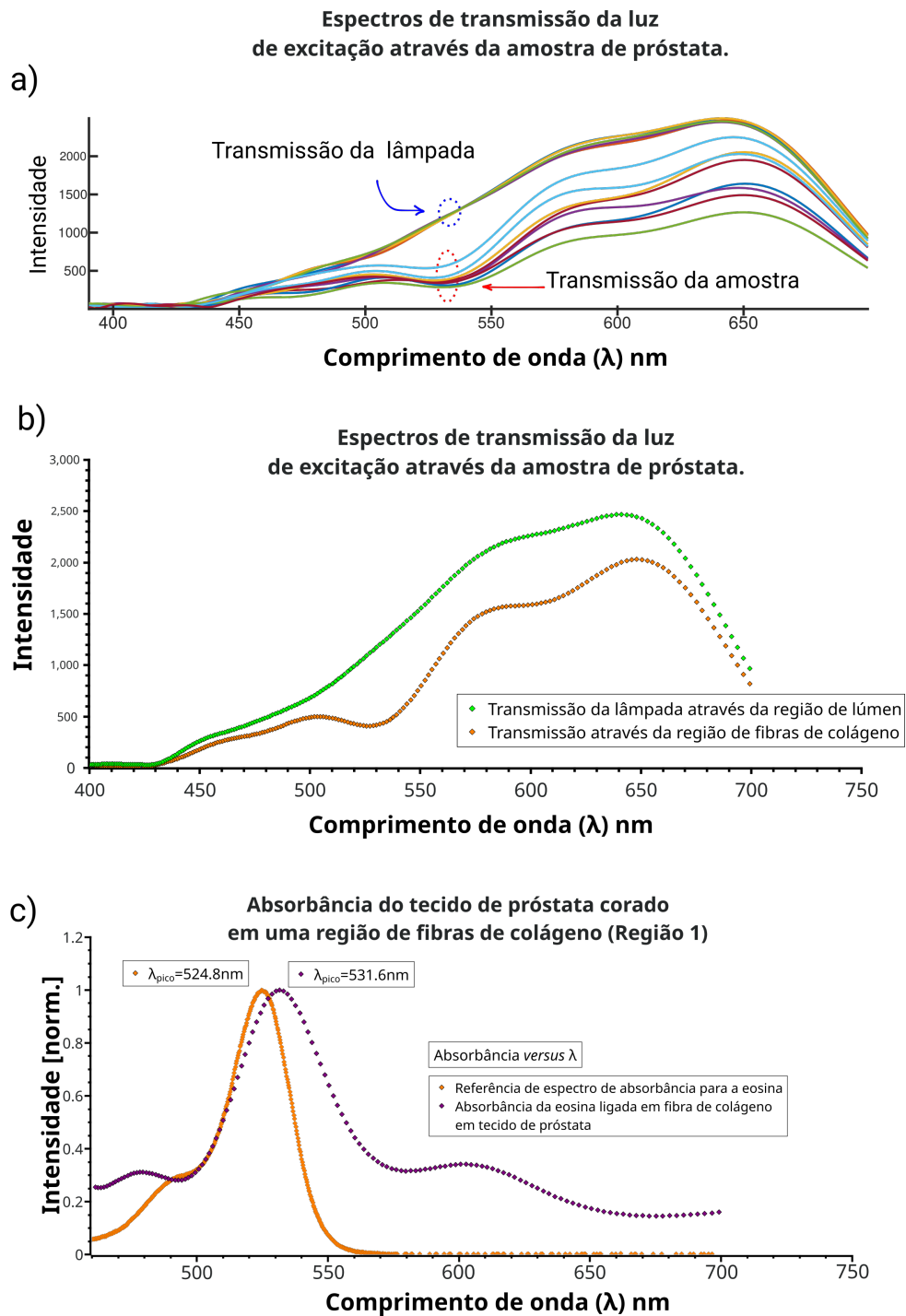


Figura 47 – (a) Espectro da luz transmitida através do tecido de próstata e da lâmpada obtidos respectivamente através de pixels próximos localizados na região 1 (fibras) em uma região de lúmen da amostra. (b) Espectros selecionados para o cálculo da absorbância da amostra. (c) Absorbância da região de fibras de colágeno na região 1 da amostra obtida através do MH e referência da absorbância da eosina obtida em [30].

8 Conclusão e perspectivas

Neste trabalho apresentamos o desenvolvimento de um microscópio hiperespectral para a aplicação em materiais biológicos. Obtivemos imagens de fluorescência e transmissão com resolução espacial entre $2 \mu\text{m}$ e $10 \mu\text{m}$ e resolução espectral entre 7 nm e 9 nm na região visível do espectro eletromagnético.

Obtivemos uma imagem hiperespectral dos emissores de um aparelho celular onde identificamos diferentes assinaturas espectrais. Na microscopia por transmissão em um tecido de biópsia de próstata corado com H&E identificamos dois espectros distintos no plano da amostra: o espectro de emissão da lâmpada através da região de lúmen e o espectro de transmissão do tecido. Utilizando esses resultados obtivemos a absorvância do tecido corado e a comparação entre o espectro de absorvância da solução de eosina em etanol. O pico da absorvância do tecido corado é próximo do pico da absorvância da solução de eosina em etanol e o aspecto dos gráficos é semelhante próximo ao máximo. Obtivemos a imagem de fluorescência do tecido de próstata corado com H&E e identificamos a fluorescência da eosina ligada às fibras de colágeno. A comparação com o espectro de fluorescência da solução de eosina em etanol mostra uma boa concordância. Nas amostras de biópsia de tecido de próstata não-corado identificamos o espectro de autofluorescência das fibras de colágeno e comparamos com o espectro obtido utilizando um espectrômetro (sem resolução espacial) baseado em materiais dispersivos e encontramos uma boa concordância entre os resultados, indicando que a fluorescência observada é predominantemente devido à autofluorescência do colágeno.

Temos como perspectiva o desenvolvimento de melhorias na montagem no processo de formação da imagem e iluminação das amostras. A substituição da lente zoom por lentes de distância fixa utilizando elementos para bloqueio do laser espalhado e outras fontes de luz do laboratório está entre as primeiras modificações a serem feitas. Pretendemos utilizar as imagens de colágeno para estudos da organização e alinhamento das fibras de colágeno e como essas estruturas se comportam durante o desenvolvimento de diversas doenças em comparação com o tecido saudável. Temos interesse em obter amostras que apresentam mais de uma assinatura espectral em escala microscópica para estudos. Também temos interesse em desenvolver adaptações na montagem para aplicações em materiais e obras de arte.

Referências

- [1] Goetz, Alexander FH, Gregg Vane, Jerry E Solomon e Barrett N Rock: *Imaging spectrometry for earth remote sensing*. Science, 228(4704):1147–1153, 1985. Citado na página 1.
- [2] Goetz, Alexander FH: *Three decades of hyperspectral remote sensing of the Earth: A personal view*. Remote Sensing of Environment, 113:S5–S16, 2009. Citado na página 1.
- [3] Li, Qingli, Xiaofu He, Yiting Wang, Hongying Liu, Dongrong Xu e Fangmin Guo: *Review of spectral imaging technology in biomedical engineering: achievements and challenges*. Journal of Biomedical Optics, 18(10):100901, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 1 e 2.
- [4] Ryan, John P, Curtiss O Davis, Nicholas B Tufillaro, Raphael M Kudela e Bo Cai Gao: *Application of the hyperspectral imager for the coastal ocean to phytoplankton ecology studies in Monterey Bay, CA, USA*. Remote Sensing, 6(2):1007–1025, 2014. Citado na página 2.
- [5] Liang, Haida: *Advances in multispectral and hyperspectral imaging for archaeology and art conservation*. Applied Physics A, 106(2):309–323, 2012. Citado na página 2.
- [6] Pu, Hongbin, Lian Lin e Da Wen Sun: *Principles of hyperspectral microscope imaging techniques and their applications in food quality and safety detection: A review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18(4):853–866, 2019. Citado na página 2.
- [7] Perri, Antonio, Bárbara E Nogueira de Faria, D Cristina Teles Ferreira, Dario Polli, Daniela Comelli, Gianluca Valentini, Giulio Cerullo e Cristian Manzoni: *A Hyperspectral Camera for Remote Sensing based on a Birefringent Ultrastable Common-Path Interferometer*. Em *Hyperspectral Imaging and Sounding of the Environment*, páginas HM3C–4. Optical Society of America, 2018. Citado 4 vezes nas páginas 2, 5, 11 e 28.
- [8] Perri, A, BE Nogueira de Faria, DC Teles Ferreira, D Comelli, G Valentini, F Preda, D Polli, AM De Paula, G Cerullo e C Manzoni: *Hyperspectral imaging with a TWINS birefringent interferometer*. Optics Express, 27(11):15956–15967, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 2 e 3.
- [9] Sinclair, Michael B, David M Haaland, Jerilyn A Timlin e Howland DT Jones: *Hyperspectral confocal microscope*. Applied Optics, 45(24):6283–6291, 2006. Citado 3 vezes nas páginas 3, 4 e 18.

- [10] Epstein, Jonathan I, William C Allsbrook Jr, Mahul B Amin, Lars L Egevad, ISUP Grading Committee *et al.*: *The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma*. The American Journal of Surgical Pathology, 29(9):1228–1242, 2005. Citado na página 5.
- [11] Epstein, Jonathan I, Lars Egevad, Mahul B Amin, Brett Delahunt, John R Srigley e Peter A Humphrey: *The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma*. The American Journal of Surgical Pathology, 40(2):244–252, 2016. Citado na página 5.
- [12] Garcia, Aloísio Miguel: *Microscopia multifótons em tecidos biológicos*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2018. Citado 3 vezes nas páginas 5, 39 e 40.
- [13] Peatross, Justin e Michael Ware: *Physics of light and optics*. Brigham Young University, Department of Physics, 2011. Citado na página 7.
- [14] Perri, Antonio, Bárbara E Nogueira de Faria, Danielle C Teles Ferreira, Daniela Comelli, Gianluca Valentini, Dario Polli, Giulio N Cerullo e Cristian Manzoni: *A hyperspectral camera for conservation science, based on a birefringent ultrastable common path interferometer*. Em *Optics for Arts, Architecture, and Archaeology VII*, volume 11058, página 110580B. International Society for Optics and Photonics, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 28.
- [15] Brida, Daniele, Cristian Manzoni e Giulio Cerullo: *Phase-locked pulses for two-dimensional spectroscopy by a birefringent delay line*. Optics Letters, 37(15):3027–3029, 2012. Citado na página 11.
- [16] Candeo, A, BE Nogueira de Faria, M Erreni, G Valentini, A Bassi, AM De Paula, G Cerullo e C Manzoni: *A hyperspectral microscope based on an ultrastable common-path interferometer*. APL Photonics, 4(12):120802, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 28.
- [17] Valeur, Bernard e Mario N Berberan-Santos: *A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory*. Journal of Chemical Education, 88(6):731–738, 2011. Citado na página 16.
- [18] Wu, Yicong e Jianan Y Qu: *Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissues*. Journal of Biomedical Optics, 11(5):054023, 2006. Citado 3 vezes nas páginas 16, 17 e 45.
- [19] Day, Christina E: *Histopathology: Methods and protocols*. 2014. Citado na página 18.
- [20] Rivenson, Yair, Hongda Wang, Zhensong Wei, Kevin de Haan, Yibo Zhang, Yichen Wu, Harun Günaydın, Jonathan E Zuckerman, Thomas Chong, Anthony E Sisk

- et al.*: *Virtual histological staining of unlabelled tissue-autofluorescence images via deep learning*. *Nature Biomedical Engineering*, 3(6):466, 2019. Citado na página 18.
- [21] Nolte, Andreas, Lutz Höring e Michael W. Davidson: *Fundamentals of Illumination Sources for Optical Microscopes*. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/lightsources/lightsourcefundamentals.html>. Citado na página 19.
- [22] Fortner, Brand e Theodore E Meyer: *Number by colors: a guide to using color to understand technical data*. Springer Science & Business Media, 2012. Citado 3 vezes nas páginas 20, 21 e 22.
- [23] Bowmaker, James K e HJk Dartnall: *Visual pigments of rods and cones in a human retina*. *The Journal of Physiology*, 298(1):501–511, 1980. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 23.
- [24] Faria, Bárbara Elza Nogueira de: *Hyperspectral Imaging and Time-resolved Spectroscopy of Photoexcited Processes in Biomolecules*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2020. Citado na página 25.
- [25] *Köhler Illumination*. <https://www.olympus-lifescience.com/pt/microscope-resource/primer/anatomy/kohler/>. Citado na página 31.
- [26] Laskin, Alexander, Peter Kaiser, Vadim Laskin e Aleksei Ostrun: *Laser beam shaping for biomedical microscopy techniques*. Em *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care V*, volume 9887, página 98872E. International Society for Optics and Photonics, 2016. Citado na página 34.
- [27] *Wavelength Calibration Spectrum (Hg Lamp)*. https://www.princetoninstruments.com/wp-content/uploads/2020/04/Intellical_wavelength_chart_2014.pdf. Citado na página 37.
- [28] *Technical specifications: Samsung Galaxy J5 SM-J500M*. <https://manual-user-guide.com/samsung-galaxy-j5-sm-j500m>. Citado na página 39.
- [29] Garcia, Aloísio M, Felipe L Magalhes, Jaqueline S Soares, Eduardo Paulino Junior, Mário F R de Lima, Marcelo Mamede e Ana M de Paula: *Second harmonic generation imaging of the collagen architecture in prostate cancer tissue*. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 4(2):025026, 2018. <http://stacks.iop.org/2057-1976/4/i=2/a=025026>. Citado na página 39.
- [30] *Wavelength Calibration Spectrum (eosin)*. <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/061.html>. Citado 3 vezes nas páginas 47, 49 e 50.

Apêndices

APÊNDICE A – Diferença de fase a partir da diferença de caminho em um cristal birrefringente

A.1 Diferença de caminho para as componente do campo Elétrico em um material birrefringente

A Figura 48 apresenta um diagrama da propagação de uma onda plana em um cristal birrefringente negativo, isto é com o índice de refração $n_e < n_o$. A birrefringência é a apresentada de maneira exagerada, para visualização. Para o cristal de $\alpha - BBO$ índice de refração extraordinário é $n_e = 1,56$ e o índice de refração ordinário é $n_o = 1,68$, fazendo com que a separação máxima entre os raios seja da ordem de $10^{-5}m$ para um cristal de espessura $d = 2.4mm$.

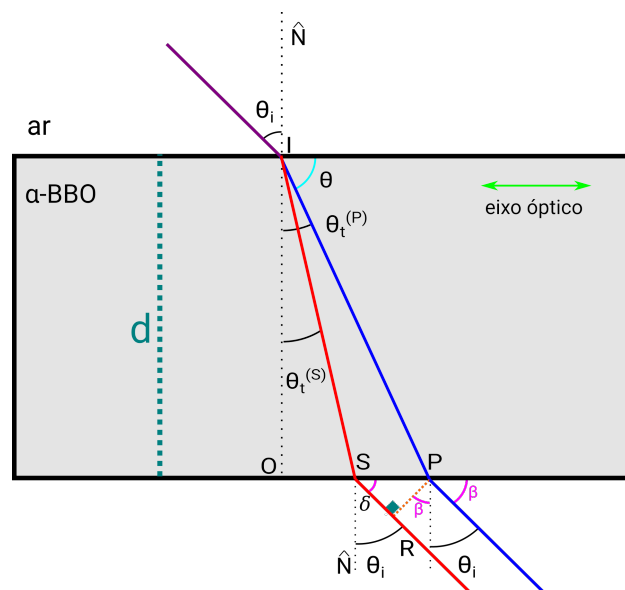


Figura 48 – Refração de um onda plana em um cristal birrefringente. Diferenças de trajetória entre cada uma das polarizações do campo Elétrico.

A birrefringência é um fenômeno em que as duas componentes de polarização do feixe incidente se propagam com velocidades distintas no interior de um material devido a anisotropia do meio. A descrição da birrefringência é simplificada se escolhermos o referencial do plano de incidência para descrever a polarização das componentes do Campo

Elétrico do feixe luminoso. Tratando o feixe como uma onda plana que se propaga na direção \vec{k} contido no plano de incidência, decompos o campo elétrico da onda mais geral possível para o raio refratado em duas componentes; (S) - a componente de polarização perpendicular ao plano de incidência - e (P) - a componente de polarização paralela ao plano de incidência. Essa notação tem a vantagem de ser independente de um referencial externo (referencial do laboratório).

Com relação aos elementos da figura 48 temos:

- \hat{N} : A normal em relação à superfície do cristal.
- θ_i : O ângulo entre a onda plana e \hat{N} , o ângulo de incidência.
- $\theta_t^{(P)}$ e $\theta_t^{(S)}$: O ângulo de refração de cada uma componentes da polarização do campo elétrico da onda incidente.
- θ : O ângulo entre o raio refratado com polarização (P) e eixo óptico.
- d : A espessura do cristal birrefringente.
- β : O ângulo complementar de θ_i .
- δ : A diferença de caminho óptico entre as duas componentes após deixar o cristal.

Cada uma das componente da polarização do Campo Elétrico (C.E.) possui um ângulo de refração e portanto propagam-se em trajetórias distintas dentro do cristal. Chamemos de \overline{IP} a trajetória percorrida pela componente de polarização (P) do C.E. e de \overline{IS} a trajetória percorrida pela componente de polarização (S) do C.E. Em uma inspeção da figura vemos ainda que trajetória da componente (P) é maior por um comprimento δ em relação à trajetória da componente (S) após deixar o cristal.

Os segmentos de reta \overline{IP} e \overline{IS} são as hipotenusas dos triângulos retângulos IOP e IOS respectivamente, onde o cateto adjacente ao ângulo de refração é o mesmo para ambos os casos e corresponde à espessura d do material birrefringente. Os comprimentos desses segmentos são obtidos através das relações trigonométricas dos triângulos retângulos:

$$\overline{IP} = \frac{d}{\cos\theta_t^{(P)}} \quad (\text{A.1})$$

$$\overline{IS} = \frac{d}{\cos\theta_t^{(S)}} \quad (\text{A.2})$$

O caminho δ é obtido também através de relações trigonométricas do triângulo RPS . A Figura 49 mostra com detalhe o triângulo RPS , chamando atenção para o fato de que um dos ângulos internos tem a mesma medida do ângulo de incidência, uma vez que β é o ângulo complementar do ângulo de incidência, conforme indicado na Figura 48.

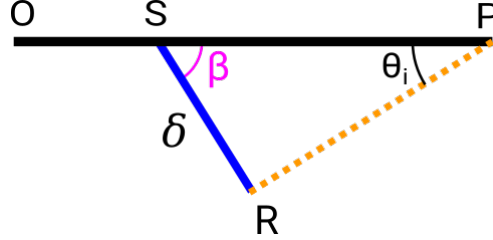


Figura 49 – Detalhe da diferença da trajetória no exterior do cristal birrefringente.

O caminho δ da Figura 49 é dado por:

$$\delta = \overline{SP} \operatorname{sen}\theta_i. \quad (\text{A.3})$$

O comprimento \overline{SP} pode ser escrito como $\overline{SP} = (x_P - x_S)$. Substituindo na expressão A.3, temos:

$$\delta = \operatorname{sen}\theta_i (x_P - x_S). \quad (\text{A.4})$$

Inspecionando a Figura 48, escrevemos x_P e x_S em termos das grandezas conhecidas a partir das relações trigonométricas nos triângulos IOP e IOS . Onde x_P e x_S são medidos a partir do ponto O.

$$\operatorname{tg}\theta_t^{(P)} = \frac{x_P}{d} \quad (\text{A.5})$$

$$\operatorname{tg}\theta_t^{(S)} = \frac{x_S}{d} \quad (\text{A.6})$$

Substituindo as expressões para x_S e x_P na equação A.4, temos a expressão para δ em termos das grandezas conhecidas:

$$\delta = d (\operatorname{tg}\theta_t^{(P)} - \operatorname{tg}\theta_t^{(S)}) \operatorname{sen}\theta_i \quad (\text{A.7})$$

Substituindo as expressões A.1, A.2 e A.7, dividindo cada caminho pelo respectivo comprimento de onda, e finalmente multiplicando por 2π temos a expressão para diferença de fase entre as duas componentes em função da diferença de caminho para o primeiro cristal.

$$\Delta\phi_{\text{cristal1}} = 2\pi \left\{ \left[\frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S)}}}{\frac{\lambda}{n_o}} + d \operatorname{sen}\theta_i \frac{(\operatorname{tg}\theta_t^{(P)} - \operatorname{tg}\theta_t^{(S)})}{\lambda_{\text{vac}}} \right] - \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P)}}}{\frac{\lambda}{n_e(\theta)}} \right\} \quad (\text{A.8})$$

O termo de diferença de fase corresponde a diferença de caminho δ será desprezado no cálculo da diferença de fase final. Essa simplificação pode ser feita pois a diferença de

fase dos feixes entre os dois blocos de cristal é nula. Entretanto esse cálculo é útil para o cálculo da diferença de fase δ' do segundo bloco que não será desprezada.

$$\Delta\phi_{cristal1} = 2\pi \left(\frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S)}}}{\frac{\lambda}{n_o}} - \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P)}}}{\frac{\lambda}{n_e(\theta)}} \right) \quad (\text{A.9})$$

Em seguida, repetimos o procedimento para o cálculo da diferença de fase no segundo cristal birrefringente utilizando a Lei de Snell usual, pois o índice de refração não varia com o ângulo de transmissão uma vez que o ângulo entre o raio refratado e o eixo óptico é constante nessa situação. Como há uma separação entre os dois blocos de cristal, a partir da Lei de Snell temos que o ângulo de incidência no segundo cristal é o mesmo para as duas componentes do C. E. e pois são iguais ao ângulo de incidência θ_i no primeiro cristal. Para não gerar confusão com a notação, modificamos os rótulos das componentes de polarização indicadas no segundo bloco, pois os ângulos de transmissão não são necessariamente iguais. O cálculo da diferença de fase no interior do cristal é obtido de maneira semelhante, trocando apenas o índice de refração que cada uma das componentes experimenta. As trajetórias de cada uma das componentes de polarização S2 e P2 no interior do bloco 2 são indicadas na Figura 50.

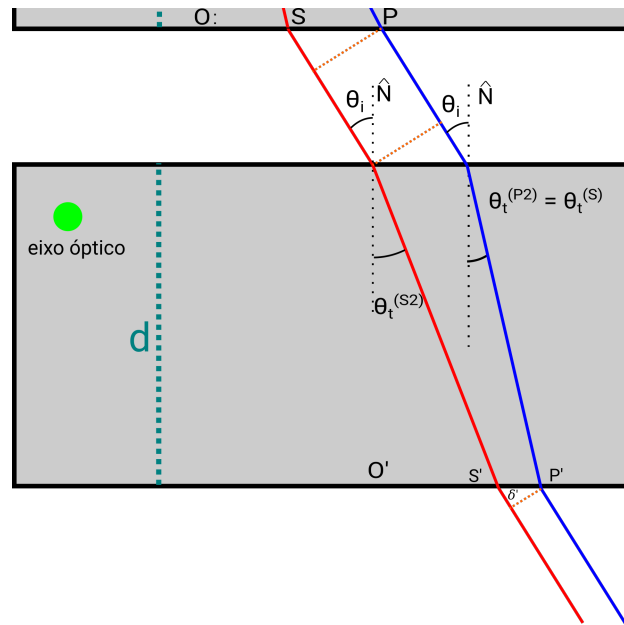


Figura 50 – Trajetórias das componentes de polarização S2 e P2 no bloco 2 com o eixo óptico perpendicular ao plano de incidência indicado pelo ponto verde.

A componente de polarização perpendicular ao plano de incidência é agora indicada por S2 e componente de polarização paralela ao plano é agora indicada por P2. S' e P' representam a distância até o ponto O' de origem para a medição de x_{S2} e x_{P2} . A expressão

para a diferença de fase das com componentes $S2$ e $P2$ é a mesma feita anteriormente, trocando apenas os índices de refração de que cada uma experimenta. A componente que experimenta o índice de refração extraordinário n_e (constante) agora é a componente $S2$ e a componente que experimenta o índice de refração ordinário n_o é a componente ($P2$).

Há também uma contribuição para a diferença de fase do termo δ' que nessa figura aparece na trajetória da componente $S2$. Entretanto a contribuição da diferença de fase de δ' deve ser somada a diferença de fase da componente $P2$. Isso ocorre pois as componentes se cruzam no interior do bloco de de cristal e isso não é observado em um diagrama onde a birrefringência é exageradamente apresentada. O cálculo da trajetória δ' feito com base no diagrama apresentado na figura 51. De maneira semelhante à equação A.4, a expressão para δ' é dada por:

$$\delta' = (x_{P'} - x_{S'}) \text{sen} \theta_i. \quad (\text{A.10})$$

A expressão para $x_{S'}$ em termos das grandezas conhecidas é

$$x_{S'} = d \tan \theta_t^{(S2)}. \quad (\text{A.11})$$

A expressão para $x_{P'}$ é

$$x_{P'} = (x_P - x_S) + d \tan \theta_t^{(P2)}. \quad (\text{A.12})$$

O termo $(x_P - x_S)$ é acrescentado pois a componente ($P2$) incide sobre um bloco em um ponto diferente da componente ($S2$) por esse termo. A expressão para $(x_P - x_S)$ é dada por

$$(x_P - x_S) = d (tg \theta_t^{(P)} - tg \theta_t^{(S)}). \quad (\text{A.13})$$

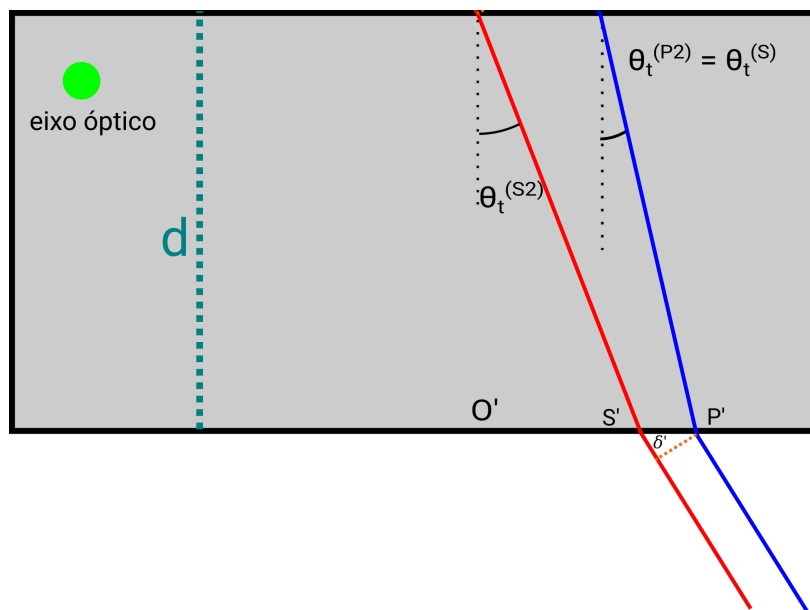


Figura 51 – Diagrama para cálculo da trajetória δ'

A substituição na equação A.12 resulta em

$$(x_{P'} - x_{S'}) = d [(tg\theta_t^{(P)} - tg\theta_t^{(S)}) + tan\theta_t^{(P2)}]. \quad (\text{A.14})$$

E então escrevemos a expressão para $(x_{P'} - x_{S'})$ em termos das grandezas conhecidas como

$$(x_{P'} - x_{S'}) = d \{[(tg\theta_t^{(P)} - tg\theta_t^{(S)}) + tan\theta_t^{(P2)}] - tan\theta_t^{(S2)}\}. \quad (\text{A.15})$$

A substituição desse resultado na expressão A.10 leva à expressão para a trajetória δ' no exterior do bloco maciço de cristal em termos das grandezas conhecidas.

$$\delta' = d \{[(tg\theta_t^{(P)} - tg\theta_t^{(S)}) + tan\theta_t^{(P2)}] - tan\theta_t^{(S2)}\} \sin \theta_i. \quad (\text{A.16})$$

Conforme discutido acima, a δ' pertence a trajetória da componente (P2) e deve ser associado a diferença de caminho dessa componente. Para manter a consistência então devemos valer a expressão $(x_{S'} - x_{P'})$ que é obtida simplesmente trocando o sinal dos termos da expressão acima

$$\delta' = d \{tan\theta_t^{(S2)} - [(tg\theta_t^{(P)} - tg\theta_t^{(S)}) + tan\theta_t^{(P2)}]\} \sin \theta_i. \quad (\text{A.17})$$

A diferença de fase entre as componente no bloco maciço é dada por

$$\Delta\phi_{cristal2} = 2\pi \left\{ \left[\frac{\delta'}{\lambda_{vac}} + \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P2)}}}{\frac{\lambda}{n_o}} \right] - \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S2)}}}{\frac{\lambda}{n_e}} \right\}, \quad (\text{A.18})$$

e a substituição da expressão para δ' resulta em

$$\Delta\phi_{cristal2} = 2\pi \left\{ \left[d \operatorname{sen}\theta_i \frac{tg\theta_t^{(S2)} - ((tg\theta_t^{(P)} - tg\theta_t^{(S)}) + tg\theta_t^{(P2)})}{\lambda_{vac}} + \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P2)}}}{\frac{\lambda}{n_o}} \right] - \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S2)}}}{\frac{\lambda}{n_e}} \right\}. \quad (\text{A.19})$$

A diferença de fase total é a soma das diferenças que ocorrem em todo o caminho óptico e equivalente a soma das duas expressões. É mais atraente agrupar os termos de diferença de fase da mesma componente para visualização. Usando esse artifício a diferença de fase total após a trajetória através dos dois blocos de cristal é

$$\Delta\phi_{total} = 2\pi \left\{ \left[\frac{\delta'}{\lambda_{vac}} + \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P)}}}{\frac{\lambda}{n_e(\theta)}} + \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P2)}}}{\frac{\lambda}{n_o}} \right] - \left[\frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S)}}}{\frac{\lambda}{n_o}} + \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S2)}}}{\frac{\lambda}{n_e}} \right] \right\}. \quad (\text{A.20})$$

Aqui podemos fazer ainda mais uma simplificação na expressão, ao identificarmos a igualdade

$$\frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P2)}}}{\frac{\lambda}{n_o}} = \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S)}}}{\frac{\lambda}{n_o}}. \quad (\text{A.21})$$

Essa igualdade vem do fato de que as componentes tem o mesmo ângulo de incidência e percebem o mesmo índice de refração (porém em cristais diferentes). Como os cristais tem a mesma espessura, por simetria vemos que a diferença de fase devido a contribuição desses termos se anula.

$$\Delta\phi_{total} = 2\pi \left\{ \left[\frac{\delta'}{\lambda_{vac}} + \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P)}}}{n_e(\theta)} \right] - \left[\frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S2)}}}{n_e} \right] \right\}. \quad (A.22)$$

Reescrevendo a equação A.22 em termos das grandezas conhecidas, temos

$$\Delta\phi_{total} = 2\pi \left\{ \left[\frac{d \left(\tan\theta_t^{(S2)} - ((tg\theta_t^{(P)} - tg\theta_t^{(S)}) + \tan\theta_t^{(P2)}) \right) \sin\theta_i}{\lambda_{vac}} + \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P)}}}{n_e(\theta)} \right] - \left[\frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S2)}}}{n_e} \right] \right\}. \quad (A.23)$$

Após essa expressão utilizamos a igualdade

$$\tan\theta_t^{(P2)} = \tan\theta_t^{(S)},$$

resultante da Lei de Snell usual aplicada às componentes (S) e ($P2$) para reduzir a expressão final para a forma

$$\Delta\phi_{total} = 2\pi \left\{ \left[\frac{d \left(tg\theta_t^{(P)} - \tan\theta_t^{(S2)} \right) \sin\theta_i}{\lambda_{vac}} + \frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(P)}}}{n_e(\theta)} \right] - \left[\frac{\frac{d}{\cos\theta_t^{(S2)}}}{n_e} \right] \right\} \quad (A.24)$$

Nas figuras utilizadas para representar a birrefringência, representamos a separação entre as componentes de polarização de maneira exagerada. Após a identificação dos ângulos e o cálculo da diferença de fase entre as componentes, identificamos que as componentes inicialmente separadas no cristal 1 cruzam-se novamente no interior do cristal 2 e tornam a se separar novamente no sentido oposto. Isso pode ser observado pela identidade entre os ângulos $\theta_t^{(P2)} = \theta_t^{(S)}$ que ocorre devido ao fato dos eixos ópticos do material birrefringente serem cruzados. O cruzamentos das componentes de polarização é representado na figura52 onde novamente a birrefringência é representada de maneira exagerada mas levando em conta os resultados numéricos da diferença de fase entre as componentes indicando que as componentes se cruzam (a diferença de fase positiva entre os feixes considerando apenas o cristal 1 torna-se negativa quando levamos em conta a propagação através do cristal 2). A separação máxima entre os feixes $\kappa_1 \approx (x_P - x_S)$ ocorre na extremidade final do cristal 1 e é da ordem de 10^{-6} m para $\theta_i < 10^\circ$. Após passar pelo segundo cristal a separação máxima entre os feixes é $\kappa_2 \approx (x_{S'} - x_{P'})$ e para um ângulo de incidência $\theta_i < 10^\circ$ é da ordem de 10^{-8} m, um valor de ordem 10^2 menor que a largura dos pixels do detetor de imagens.

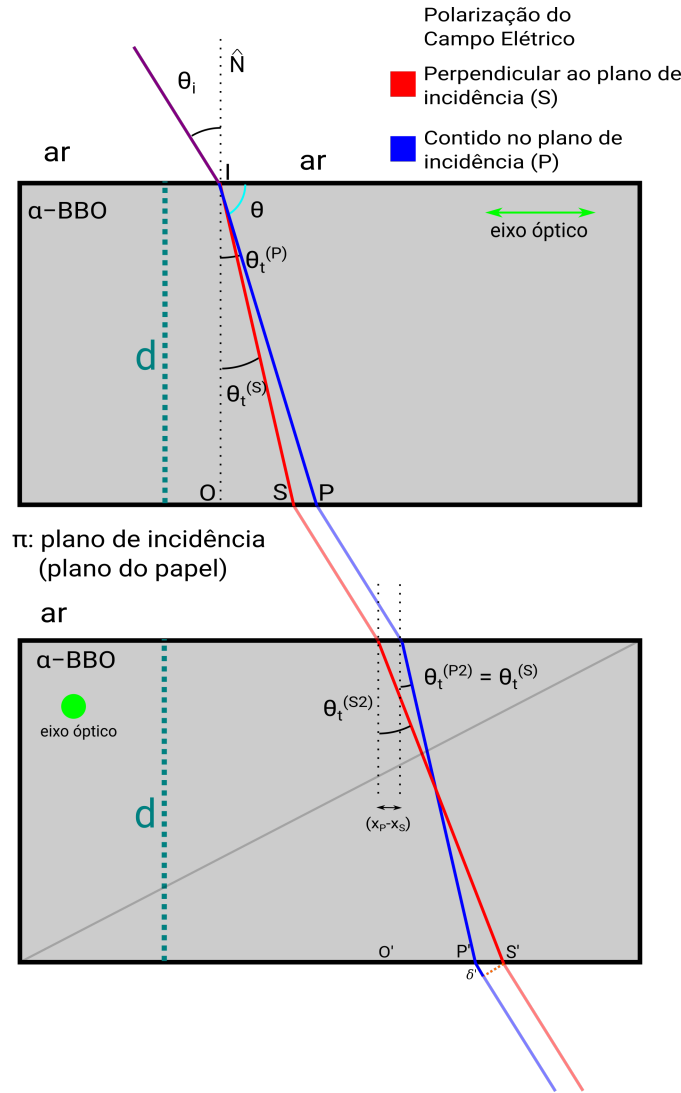


Figura 52 – Diagrama indicando as trajetórias de cada uma das componentes (S) e (P) da polarização do campo elétrico. Os raios totalmente preenchidos representam os caminhos onde há diferença de fase. Os raios semitransparentes indicam os trechos em que a diferença de fase é nula entre as componentes.

As equações A.8 e A.24 mostram que a diferença de fase é uma função do ângulo de incidência θ_i e também do comprimento de onda incidente λ . A figura 53 mostra a diferença de fase entre as componentes do campo elétrico em função do ângulo de incidência da onda plana sobre o cristal birrefringente. O gráfico foi obtido com base na equação A.8. No eixo y foi plotado a grandeza $\frac{\Delta\phi_{total}}{\pi}$. Para N_{par} no eixo x tem-se interferência construtiva total e para N_{impar} tem-se interferência destrutiva total para o ângulo de incidência.

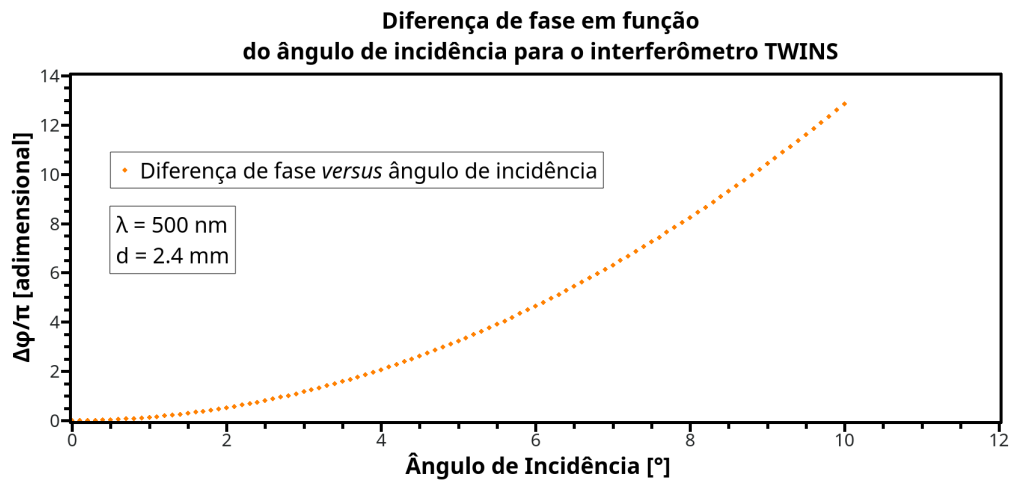


Figura 53 – Diferença de fase em função do ângulo de incidência para um cristal birrefringente.

ANEXO A – Espectro de emissão da lâmpada de Hg utilizada para a calibração do MH

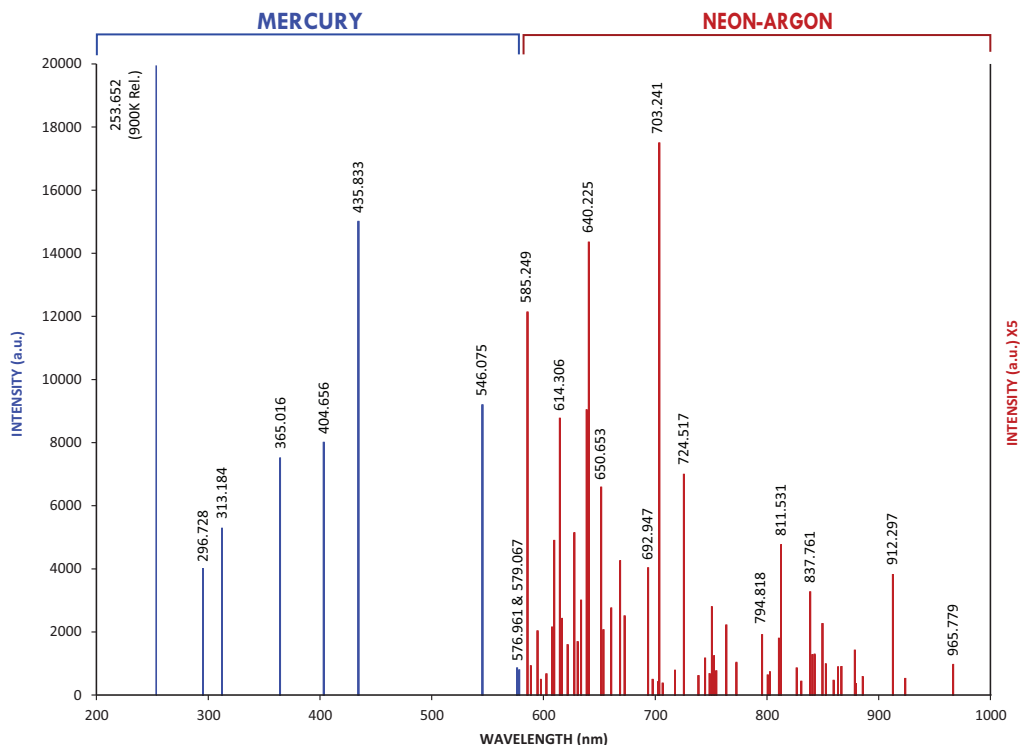
Espectro de emissão da lâmpada de Hg fornecido pela fabricante *Princeton Instruments*.

WAVELENGTH CALIBRATION SPECTRUM

* INDICATES STRONG LINE WITHIN WAVELENGTH GROUP () INDICATES 2ND OR 3RD ORDER

Princeton Instruments

IntelliCal® Wavelength Calibration Source



MERCURY

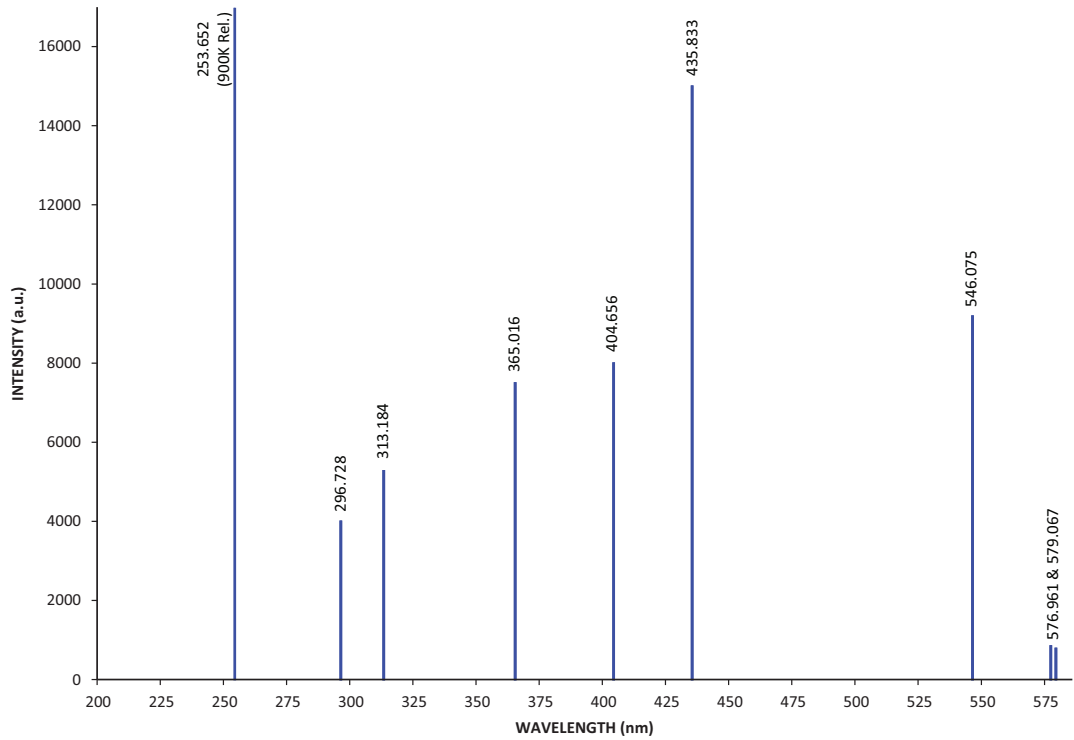
ARGON

NEON

	100	200	300	400	500	600	700	800	900 - 1100
MERCURY	184.950 194.227	226.223 237.832 248.200 253.652* 265.204 280.346 289.360 296.728	302.15 312.567 313.155 313.184 334.148 365.016* 365.484 366.328	404.656 407.784 433.922 (vw) 434.7506 (vw) 435.833*	507.304* (2 x 253.65) 546.075* 576.961 579.067	625.14 (2 x 312.57) 626.37 (2 x 313.184)	730.03 (2 x 365.016) 760.95 (3 x 253.65)	871.66 (2 x 435.833)	1013.975* 1014.61 (4 x 253.65)
ARGON				404.442 415.859* 416.418 418.188 419.103 420.067* 425.936 427.217 430.010 433.356		696.543*	706.722 727.294 738.398 750.387* 751.465 763.511* 772.376 794.818	800.616 801.479 810.369 811.531* 826.452 840.821 842.465 852.144 866.794	912.297* 922.450 965.779 978.450 1047.005 1067.3565
NEON			336.99 341.790 344.770 346.658 347.257 352.047* 359.353		533.078 534.109 540.056 585.249* 588.190 594.483 597.553	603.000 607.434 609.616* 614.306* 616.359 621.728 626.650 630.479 633.443 638.299* 640.225* 650.653* 653.288 659.895 667.828* 671.704 692.947	702.405 703.241* 705.911 717.394 724.517* 747.244 748.887 753.577 754.404 783.906 794.318	808.246 811.855 813.641 825.938 826.608 830.033 836.575 837.761* 849.536 863.465 865.438 878.062 878.375 885.387	920.176 1056.241 1079.804 1084.448*

WAVELENGTH CALIBRATION SPECTRUM

Princeton Instruments
USB Hg Source



Princeton Instruments
USB Ne-Ar Source

